NUEVAS TENDENCIAS EN MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

Albert Bordons, Joaquín Bautista-Gallego, M. Carmen Portillo, Albert Mas (Eds.)







Edita: Universitat Rovira i Virgili
ISBN: 978-84-8424-703-6
1.ª edición: septiembre de 2018

ÍNDICE

COMUNICACIONES de SESIONES TEMÁTICAS

PRÓLOGO

Estimados amigos y compañeros,

Ha sido un honor para el grupo de Biotecnología Enológica de la Facultad de Enología de la Universidad Rovira i Virgili (URV), y para mí en particular, el encargo de la organización del XXI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos de la SEM. Hemos intentado esforzarnos para que esta edición esté a la altura de las anteriores, para que todos los que trabajamos en Microbiología de los Alimentos podamos conocer los últimos avances y las nuevas tendencias en las diversas temáticas de nuestro ámbito.

Como veréis en las sesiones programadas, en esta edición hemos intentado considerar tanto los aspectos de los beneficios de los microorganismos, o sea, los implicados en procesos fermentativos de alimentos, o por supuesto los probióticos y otros microorganismos relacionados con alimentos funcionales, como los aspectos negativos de los microorganismos relacionados con seguridad alimentaria, incluyendo las técnicas más recientes y la microbiología predictiva. También se han incluido sesiones de aspectos quizás no tan contemplados antes, como las interrelaciones entre los diversos microorganismos presentes en los alimentos, o una sesión dedicada a la microbiología de alimentos de origen marino.

Agradezco vuestra participación en el Congreso, deseo que científicamente os sea interesante y que tanto los coloquios como las pausas y sesiones de posters sean productivos en las interrelaciones entre todos vosotros. Debo señalar que la realización del Congreso no hubiera sido posible sin la colaboración y trabajo del resto de miembros del Comité Organizador y del Comité Científico, así como de la Junta Directiva del Grupo de Microbiología de Alimentos de la SEM. Gracias a todos ellos. También agradezco el trabajo de gestión por parte del personal de la Fundació URV. Doy gracias a la URV por las facilidades para celebrar este Congreso, y agradezco el patrocinio recibido por parte de diversas empresas, así como de organismos como la FEMS y la Diputación de Tarragona.

Como sedes del Congreso, hemos optado por dos localizaciones de nuestra misma universidad en el centro de Tarragona (Campus Catalunya y el Rectorado), en lugar de recurrir a nuestro Campus científico-técnico de Sescelades, un poco alejado del centro, para que podáis desplazaros andando desde los hoteles al Congreso y al centro en pocos minutos. El Campus Catalunya, que alberga las facultades de Derecho y Humanidades, aparte de ser céntrico, dispone de todas las infraestructuras y espacios para una satisfactoria realización del Congreso. El Rectorado, en cuyo Paraninfo celebraremos la última sesión y la clausura el jueves 20, es un edificio con fachada de estilo modernista, completamente reformado, situado en el casco antiguo (*la Part Alta*) detrás de la Catedral.

Aprovecho la ocasión para daros la bienvenida a Tarragona, donde espero que disfrutéis de unos días placenteros en nuestra mediterránea ciudad, rica en patrimonio y con un ambiente tranquilo, acogedor y festivo. Precisamente al finalizar el Congreso empiezan los días álgidos de la fiesta mayor de Tarragona: Santa Tecla, el 23 de septiembre. ¡¡ Os esperamos !!

¡¡ Bienvenidos a Tarragona y a la URV !! *Benvinguts !!*

Albert Bordons, Presidente del Comité Organizador

COMITÉS

COMITÉ DE HONOR

Joaquim Torra i Pla	President de la Generalitat de Catalunya
M. José Figueras Salvat	Rectora de la Universitat Rovira i Virgili
Teresa Cunillera i Mestres	Delegada del Gobierno de España en Cataluña
Teresa Jordà i Roura	Consellera d'Agricultura, Ramaderia, Pesca i Alimentació de la Generalitat de Catalunya
Josep Félix Ballesteros Casanova	Alcalde de Tarragona
Josep Poblet i Tous	Presidente de la Diputación de Tarragona
Antonio Ventosa Ucero	Presidente de la Sociedad Española de Microbiología (SEM)
Gonzalo Doroteo García de Fernando Minguillón	Presidente del Grupo de Microbiología de Alimentos de la SEM
Josep Usall i Rodié	Director General del Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
Joan Miquel Canals Bosch	Decano de la Facultad de Enología de Tarragona

COMITÉ CIENTÍFICO

Albert Mas, coordinador	Universitat Rovira i Virgili (URV)
Joaquín Bautista-Gallego	Instituto de la Grasa (IG) - CSIC
M. Carmen Portillo	URV
Albert Bordons	URV
José Manuel Guillamón	Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) - CSIC
Ramón González	Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV) - CSIC - Universidad de la Rioja
Antonia Picón	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Baltasar Mayo	Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA) - CSIC
Sergi Ferrer	Universitat de València
Amparo Querol	IATA
Margarita Garriga	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)
David Rodríguez-Lázaro	Universidad de Burgos
Mercedes Maqueda	Universidad de Granada
Manuel Ramírez	Universidad de Extremadura
Rosa del Campo	Hospital Ramón y Cajal - Universidad Complutense de Madrid (UCM)
Evaristo Suárez	Universidad de Oviedo
Noé Arroyo	IG - CSIC
M. Dolores Rodrigo	IATA - CSIC
Jesús L. Romalde	Universidade de Santiago de Compostela
Miguel Ángel Moriñigo	Universidad de Málaga
Anna Jofré	IRTA
Antonio Valero	Universidad de Córdoba
Sara Bover Cid	IRTA
Josep M. Montfort	IRTA
Gonzalo García de F. Minguillón	UCM
Carlos Alonso	Universidad de León
Marta Hernández	Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL)
Santiago Condón	Universidad de Zaragoza
Nacho Álvarez	Universidad de Zaragoza
Francisco Javier Carballo	Universidade de Vigo
Vicent Sanchís	Universitat de Lleida
M. Elena González-Fandos	Universidad de la Rioja

COMITÉ ORGANIZADOR

Albert Bordons	Presidente	Universitat Rovira i Virgili
Joaquín Bautista-Gallego	Vicepresidente y secretario	Instituto de la Grasa - CSIC
M. Carmen Portillo	Vicepresidenta y tesorera	URV
Albert Mas	Vocal	URV
Cristina Reguant	Vocal	URV
M. Jesús Torija	Vocal	URV
Gemma Beltrán	Vocal	URV
Gemma Sánchez	Colaboradora	Fundación URV - Congresos

PROGRAMA

Lunes 17 septiembre 2018, Campus Catalunya URV (Av .Catalunya 35, Tarragona)

15h Entrega de credenciales y documentación

16h Acto inaugural (*Aula Magna*)

16h30 Conferencia inaugural: Patógenos emergentes de interés alimentario y gestión de riesgos. **Ana Troncoso**, Universidad de Sevilla.

17h30 Refrigerio de bienvenida

19h-20h30 Visita guiada a la Tarragona romana y medieval

Martes 18 septiembre 2018, Campus Catalunya URV

9h Sesiones temáticas paralelas 1A y 1B (cada sesión incluye una ponencia principal de 30 min, comunicaciones orales seleccionadas de 10 min o invitadas de 20 min, y un fórum de 30 min) :

1A. Bebidas fermentadas alcohólicas (*Aula Magna*). Moderadores: José Manuel Guillamón (IATA-CSIC Valencia) y Ramón González (ICVV-CSIC-UR Logroño).

Ponencia principal: Mecanismos moleculares implicados en la adaptación de las levaduras a los procesos fermentativos y sus posibles aplicaciones. **Amparo Querol**, IATA-CSIC Valencia.

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

Mechanisms of adaptation in yeast to industrial fermentation. E. García-Ríos (IATA-CSIC Valencia)

Evaluación de la capacidad deteriorante de bacterias lácticas presentes en una cerveceria artesanal. M. Rodríguez-Saavedra (CIAL-CSIC-UAM Madrid)

El transcriptoma de *Saccharomyces cerevisiae* revela roles clave de la melatonina en la defensa contra el estrés oxidativo. M. Sunyer-Figueres (URV Tarragona)

La interacción con *M. pulcherrima* promueve una respuesta transcripcional que recuerda al efecto Crabtree en *S. cerevisiae*. J. Tronchoni (ICVV-CSIC-UR Logroño)

Uso de levaduras killer y sensibles de *Torulaspora delbrueckii* en la elaboración de vino base y cava. R. Velázquez (UEx Badajoz)

1B. Productos lácteos (*Sala de Graus*). Moderadores: Antonia Picón y Baltasar Mayo.

Ponencia principal: Aminas biógenas: el lado oscuro de las bacterias lácticas. **Miguel Ángel Álvarez**, IPLA-CSIC Villaviciosa.

Ponencias invitadas:

Técnicas microbiológicas y microbiología de quesos tradicionales. Baltasar Mayo, IPLA-CSIC Villaviciosa.

Tratamientos de altas presiones hidrostáticas en productos lácteos. Antonia Picón, INIA Madrid.

10h45 Pósters y pausa-café

11h30 Sesiones temáticas paralelas 2A y 2B (cada sesión incluye una ponencia principal de 30 min, 4 comunicaciones orales seleccionadas de 10 min y un fórum de 30 min):

2A. Fermentaciones lácticas en vegetales y vinos (*Sala de Graus*). Moderadores: Joaquín Bautista-Gallego (IG-CSIC Sevilla) y Sergi Ferrer (U. València).

Ponencia principal: Biofilms en el entorno de la fermentación de aceitunas de mesa. **F. Noé Arroyo**, IG-CSIC Sevilla.

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

La estrategia de inoculación de no-*Saccharomyces* en vinificación afecta a *Oenococcus oeni* y a la fermentación maloláctica. A. Balmaseda (URV Tarragona)

Assessment of the probiotic potential of bacterial species isolated from table olive; *Lactobacillus pentosus* vs. *Lactobacillus plantarum*. A. Benítez-Cabello (IG-CSIC Sevilla)

Detección de aminas biógenas y su relación con la microbiota indígena en vinos de la Rioja alavesa. I. Díez-Ozaeta (AZTI-Tecnalia, Derio)

Efectos del uso de no-*Saccharomyces* sobre *Oenococcus oeni* y la fermentación maloláctica del vino. C. Reguant (URV Tarragona)

2B. Tecnologías emergentes en seguridad alimentaria (*Aula Magna*). Moderadores: Amparo Querol (IATA-CSIC Valencia) y M. Carmen Portillo (URV Tarragona).

Ponencia principal: Bioconservación y tecnologías no térmicas en la inactivación de patógenos en alimentos. **Margarita Medina**, INIA Madrid.

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

Caracterización de los microorganismos en alimentos sin necesidad de cultivar: hacia una nueva era molecular en bioseguridad alimentaria. M. Mira-Miralles (U. Alicante)

Detección del virus de la hepatitis E y evaluación de la infectividad mediante RT-qPCR de viabilidad. W. Randazzo (U. València, IATA-CSIC)

Eficacia bactericida del ácido dipicolínico sobre células vegetativas. V. Ruiz-Artiga (U. Zaragoza)

Piezoprotección y piezoestimulación: efectos no deseados en la combinación de bioconservantes y altas presiones. C. Serra-Castelló (IRTA Monells)

13h15 - 15h Comida

15h - 16h30 Pósters

15h45 - 16h15 Workshop de empresa iMicroQ (*Sala de Graus*)

16h30 Sesiones temáticas paralelas 3A y 3B (cada sesión incluye una ponencia principal de 30 min, comunicaciones orales seleccionadas de 10 min y un fórum de 30 min):

3A. Productos cárnicos (*Aula Magna*). Moderadores: Margarita Garriga (IRTA Monells) y David Rodríguez-Lázaro (U. Burgos).

Ponencia principal: Resistencia a antibióticos y capacidad para formar *biofilm* en bacterias de origen cárnico: aspectos de interés para la seguridad alimentaria. **Rosa Capita**, U. León.

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

Marcadores de movilidad génica horizontal implicados en la diseminación de resistencias a los antibióticos beta-lactámicos a través de alimentos y aguas. D. González (U. Navarra, IDISNA Pamplona)

Detección del virus de la hepatitis E en alimentos derivados del cerdo. M. Gutiérrez-Boada (U. Burgos)

Reducción de sodio en productos cárnicos cocidos: consecuencias sobre la seguridad alimentaria. A. Jofré (IRTA Monells)

Selección de agentes de biocontrol para reducir el ácido ciclopiazónico en derivados cárnicos curado-madurados. M.J. Andrade (UEx Cáceres)

3B. Interacciones entre microorganismos en alimentos (*Sala de Graus*). Moderadores: Mercedes Maqueda (U. Granada) y Manuel Ramírez (UEx Cáceres).

Ponencia principal: Interacciones entre microorganismos presentes en alimentos y principales aplicaciones. **Francisco Pérez Nevado**, UEx Badajoz.

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

Efecto de distintos biocidas en la transmisión horizontal de los genes de resistencia a colistina *mcr*-1 y *mcr*-2. A. Álvarez-Molina (U. León, ICTAL León)

El agente biopreservante *Pseudomonas graminis* CPA-7 reduce la capacidad invasiva de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* después de la interacción en pera mínimamente procesada. C. Collazo (U. Lleida)

Selección de bacterias ácido lácticas con actividad anti-*Listeria monocytogenes* en alimentos madurados tradicionales. I. Martín (UEx Cáceres)

Interacción metabólica entre *Salmonella enterica* y los principales mohos causantes de podredumbre en fresas. A. Valero (U. Córdoba)

18h15 - 19h15 Asamblea del Grupo SEM Microbiología de los Alimentos *Sala de Graus*)

Miércoles 19 septiembre 2018, Campus Catalunya URV

9h Sesiones temáticas paralelas 4A y 4B (cada sesión incluye una ponencia principal de 30 min, comunicaciones orales seleccionadas de 10 min y un fórum de 30 min):

4A. Probióticos y alimentos funcionales (*Aula Magna*). Moderadores: Rosa del Campo (Hospital Ramón y Cajal Madrid - UCM) y Cristina Reguant (URV Tarragona).

Ponencia principal: Un probiótico de nueva generación desde el laboratorio al consumidor: el ejemplo de *Faecalibacterium praustnizii*. **Rebeca Martín**, INRA Jouy-en-Josas, Francia.

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

Desarrollo de probióticos para la hiperuricemia. M. Garranzo (UCM Madrid)

Producción de una bebida probiótica a partir de zumo de uvas blancas de mesa. D.L. Bazán (UVigo, Ourense)

Evaluación de la seguridad alimentaria mediante análisis genómico de 14 cepas de bacterias lácticas con potencial biotecnológico. L. Rodrigo-Torres (U. València)

4B. Nuevas tecnologías en la industria alimentaria (*Sala de Graus*). Moderadores: Noé Arroyo (IG-CSIC Sevilla) y M. Dolores Rodrigo (IATA-CSIC Valencia)

Ponencia principal: Procesado mediante nuevas tecnologías: validación y visión de futuro. **M. Consuelo Pina Pérez**, HES-SO Valais-Wallis, Suiza

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

Estudio in vivo con *Caenorhabditis elegans* para evaluar la capacidad antimicrobiana de *Brassica oleracea* var. *botrytis* frente a *Salmonella* Typhimurium. D. Ibáñez-Peinado (IATA-CSIC Valencia)

Pulsed electric field permeabilization and extraction of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. J.M. Martínez (U. Zaragoza)

Inactivación por pulsos eléctricos de alto voltaje en flujo continuo de *Saccharomyces cerevisiae* en vino. I. Álvarez (U. Zaragoza)

Efecto de la turbidez en la desinfección de *Listeria innocua* en tomate mediante la tecnología UV-C asistida por agua. I. Viñas (U. Lleida)

10h45 Pósters y pausa-café

11h30 Sesión conjunta de áreas temáticas 5A y 5B (incluye una ponencia principal de 30 min de cada área temática, comunicaciones orales y un fórum conjunto de 30 min) (*Aula Magna*). Moderadores: M. Jesús Torija (URV Tarragona) y Anna Jofré (IRTA Monells).

5A. Microbiología de alimentos de origen marino.

Ponencia principal: Detección de *Arcobacter* en alimentos de origen marino y sus posibles implicaciones para la salud pública. **M. José Figueras**, URV Reus.

Ponencia invitada: 20 años de estudios sobre la prevalencia de virus entéricos humanos en moluscos de Galicia. Jesús L. Romalde, U. Santiago.

5B. Microbiología predictiva.

Ponencia principal: Aplicación de la microbiología predictiva en la evaluación de riesgos biológicos en EFSA. **Pablo S. Fernández Escámez**, U.P. Cartagena.

Comunicaciones en póster seleccionadas para orales:

Aplicación de modelización matemática para diseñar tratamientos de carne de pollo seguros con un mínimo impacto en la calidad sensorial. M. Clemente-Carazo (U.P. Cartagena)

Desarrollo de modelos de regresión logística para la evaluación de la probabilidad de germinación de cepas adaptadas de *Clostridium sporogenes* a diferentes condiciones de pH y NaCl. F.N. Arroyo-López (IG-CSIC Sevilla)

13h30 - 15h15 Comida

15h30 - 19h30 Visita a bodegas del Penedès: Cavas Freixenet, Familia Torres

21h Cena del Congreso en Tarragona: Casa Joan Miret (Rambla Nova 36, Tarragona)

Jueves 20 septiembre 2018, Paraninfo, Rectorado URV (C. Escorxador, s/n, Tarragona)

9h Sesión plenaria con 2 conferencias:

New ecological insights in food fermentations by using next generation sequencing approaches. **Luca Cocolin**, U. Torino.

Microbioma de la leche humana. **Juan Miguel Rodríguez Gómez**, UCM Madrid.

11h Pausa-café

11h30 Conferencia magistral: Present and Future of the Omics in Food Microbiology. **Daniel Ramón**, Biopolis-Archer Daniels Midland Co.

12h30 – 14h Acto de clausura:

Entrega de premios (Mejor Tesis, Premio Joven Investigador y Mejor Póster).

Resumen de tesis del Premio Fisher Scientific a la Mejor Tesis Doctoral: Natalia Gómez Torres

Conferencia de clausura del Premio Joven: Perspectivas e implicaciones de la microbiología predictiva y evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos. **Antonio Valero**, U. Córdoba.

Clausura del Congreso

CONFERENCIAS PLENARIAS

PATÓGENOS EMERGENTES DE INTERÉS ALIMENTARIO Y GESTIÓN DE RIESGOS

Ana María Troncoso

Universidad de Sevilla/Facultad de Farmacia/Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal/Área de Nutrición y Bromatología. c/ Prof. García González nº 2, 41012 Sevilla.

amtroncoso@us.es

La seguridad alimentaria es un pilar fundamental para la protección de la salud. Su objetivo es prevenir, minimizar o eliminar riesgos alimentarios en toda la cadena alimentaria y al mismo tiempo poner a disposición de la población alimentos de calidad que satisfagan las demandas de los consumidores [1]. Sin embargo todavía se registran millones de casos anuales en todo el mundo debido a enfermedades transmitidas por alimentos [2]. Su impacto en la salud de la población es elevado así como el impacto económico, y ambos suelen ser infravalorados. Al mismo tiempo los brotes de enfermedades causadas por la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos persisten año tras año en el mundo desarrollado, permaneciendo muchas veces silenciados, mal investigados o no correctamente comunicados a las autoridades sanitarias. Asimismo la creciente globalización en la comercialización y distribución de alimentos ha propiciado la extensión y frecuencia de estos brotes junto a la introducción de nuevos patógenos que antes quedaban circunscritos a áreas geográficas determinadas [3]. Hay que señalar también otros factores como el número creciente de patógenos emergentes, los cambios en la virulencia de patógenos conocidos o la presencia de resistencia antibióticos, lo que propicia en último extremo una exposición incrementada de los consumidores a los riesgos alimentarios por presencia de agentes biológicos.

Las enfermedades transmitidas por alimentos tienen su origen en el consumo de productos contaminados con microorganismo patógenos: bacterias y sus toxinas, mohos, virus y parásitos. A su vez, los alimentos pueden contaminarse en cualquier punto de la cadena alimentaria desde la materia prima, pasando por el procesado, manipulación, conservación, distribución o la propia preparación de los alimentos. Entre los principales patógenos alimentarios se encuentran *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus,* que son los más vigilados por las administraciones sanitarias y por la industria alimentaria. No hay que olvidar que los virus suelen ser últimamente protagonistas de las redes de alerta alimentaria y que se consideran en la actualidad peligros biológicos emergentes. Estos microorganismos se diferencian en términos de epidemiología, vehículos alimentarios transmisores, fisiología y virulencia.

Los informes que anualmente publica la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) sobre Zoonosis, dan una idea de su prevalencia en el espacio europeo. Los Estados Miembros de la UE tienen la obligación de recolectar datos sobre los brotes alimentarios e información asociada a los mismos. La EFSA publica estos datos en colaboración con el Centro Europeo para la Prevención y Control de (ECDC), y son son fácilmente accesibles en la web. En cualquier caso el número de brotes (definido como la presencia de dos o más casos de una enfermedad como resultado

del consumo de una alimento contaminado en un mismo entorno) que se informa a la autoridades sanitaras es siempre sensiblemente inferior al número real [4,5]. Así los brotes que afectan a un número elevado de personas, los que se producen en el ámbito de la restauración colectiva o los que tiene mayor duración o virulencia son los que comúnmente se investigan en mayor profundidad. Hay que señalar que además existen diferencias importantes en cuanto a la sensibilidad de las diferentes autoridades sanitarias nacionales a la hora de identificar y comunicar estos datos

En EEUU el Centro para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC) reúne los datos sobre brotes alimentarios y zoonosis desde el año 1998 y que organismos internacionales como la OMS realizan esfuerzos para disponer de datos a nivel global.

En esta comunicación se presentan los brotes alimentarios de mayor calado público en los últimos años como el Brote de *E Coli verotoxigénico* por consumo de semillas germinadas de fenogreco en Alemania en la primavera de 2011 y se examinan de forma crítica los sistemas de gestión de riesgo y como éstos se han ido revisando a fin de mejorar la gestión y comunicación de los riesgos alimentarios. Al mismo tiempo y en función de los datos reportados en los ultimos años se realiza un examen crítico para identificar los patógenos emergentes más relevantes.

REFERENCIAS

[1] Schirone M., Visciano P., Tofalo R., Suzzi, G. Editorial: Biological Hazards in Food. *Front. Microbiol*. **2017**, *7*, 2154.

[2] Martinovic, T., Andjelkovic, U., Šrajer Gajdošik, M., Rešetar, D., andJosic, D. *J. Proteomics* **2016**, *146*, 226–235.

[3] Wang, S., Weller, D., Falardeau, J., Strawn, L. K., Mardones, F. O., Adell, A. D., et al. *Trends Food Sci. Technol.* **2016,** *57*, 188–198.

[4] Arendt S, Rajagopal L, Strohbehn C, Stokes N, Meyer J, Mandernach S. *Int J Environ Res Public Health*, **2013,** *10*:3684–3714.

[5] Callejón, R.M., Rodríguez-Naranjo, M.I., Ubeda, C., Hornedo-Ortega, R., Garcia-Parrilla, M.C., Troncoso, A.M. *Foodborne Pathogens and Disease*, **2015**, *12* (1), 32-38.

NEW ECOLOGICAL INSIGHT IN FOOD FERMENTATIONS BY USING NEXT GENERATION SEQUENCING APPROACHES

Cocolin L., Ferrocino I., Alessandria V., Rantsiou K.
Department of Agricultural, Forest and Food Sciences, University of Torino, Italy
lucasimone.cocolin@unito.it

Food fermentations represent unique complex ecosystems in which different microorganisms, belonging to several groups of bacteria, yeasts and filamentous fungi, coexist. The level of complexity is even higher if we consider that within a species several strains may be present. Due to the fact that microbial activity is a key factor for determining the quality and the safety of fermented foods, it is of primary importance to be able to well define and to describe correctly the microbial diversity during food fermentations.

The last 30 years have been characterized by a drastic change in the way scientists investigate population changes and dynamics during food fermentations. At the end of the 80s the introduction of molecular methods allowed for a better identification of species and the differentiation of strains within the species through the used of PCR based methods, but it is at the end of the 90s that the big change occurred with the introduction of the new concept of culture independent approach. Microbial ecology is from that point investigated by extracting the nucleic acids directly from the food matrix without the need for isolation and identification. An overview of the culture-independent and dependent methods, exploiting molecular techniques, is shown in Figure 1.

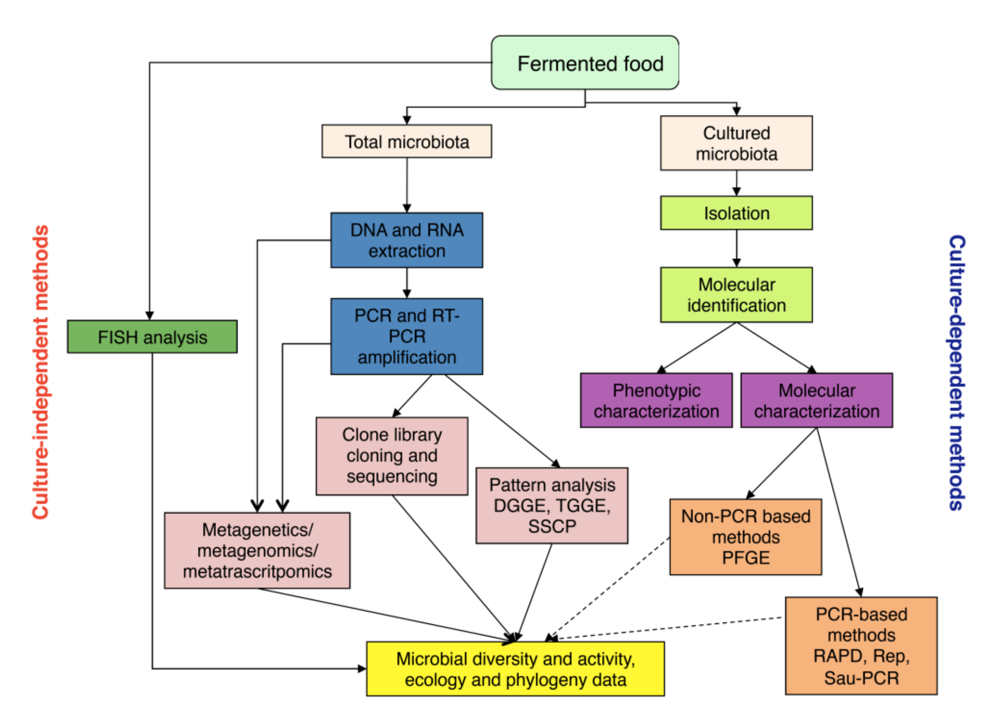


Figure 1: Molecular methods used in the study of the ecology of fermented foods

Moreover, we have learnt to study microbial ecology in fermented foods considering whole consortia and not single populations. This is extremely important since microorganisms in complex ecosystems are able to interact and communicate. If one microorganism at the

time is studies, the risk is to loose important information on how the ecosystem is functioning [1].

Undoubtedly the technological developments in the area of the sequencing methodologies have open new possibilities to study in more detail the microbial ecology of fermented foods. The previously available techniques, based on the profiling of populations (e.g Denaturing Gradient Gel Elecrophoresis), were characterized by poor depth in the coverage of microbial diversity, low throughput and pretty labor-intensive procedure. However, the first studies exploiting DGGE already highlighted that what could be seen on agar plates was a little portion of the microbial populations involved in the fermentation process. With the development of the next generation sequencing (NGS) methodologies, we have now in our hands techniques that are able to deeply investigate the diversity of microorganism and how they are interacting in very dynamic ecosystems. Not only we can reconstruct the taxonomic map of the microbes present in a given food, but we can also monitor the metabolic activities that are expressed in a specific time point. The use of metataxonomics, metagenomics and metatranscriptomics has allowed for a huge amount of new data to be generated, which can be analysed through bioinformatic tools to be able to fully understand the role of the microorganisms.

In food fermentations, NGS has been used mainly to describe the microbial ecology during the transformation process, through the amplification and the sequencing of the 16S rRNA gene (metaxonomics) and only in a few cases the functions (genes), mostly present and expressed, were investigated by using metagenomics and metatranscriptomics. In the study by Alessandria et al. [2], investigating an Italian hard cheese, the natural whey starters used in the three productions showed the same microbiota composition, characterized by the presence of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii*. A clear clustering of the samples according to the three productions, probably driven by the different milks used, was observed. Milk samples were found to be characterized by the presence of several contaminants, such as *Propionibacterium acnes, Acidovorax, Acinetobacter, Pseudomonas*, and NSLAB. The core genera of the starter tended to limit the development of the spoilage bacteria only in two of the three batches. The study underlined the influence of different factors that can affect the final microbiota composition of the artisanal cheese.

Lastly, meta-omics were recently investigated to depict microbial metabolic functions during the fermentation of Italian sausages [3]. Microbiota, microbiome, and the release of volatile metabolites were determined with the aim to discover the connections between them during ripening The microbial ecology of spontaneously fermented sausages and those inoculated with a starter culture was studied. The inoculated fermentation with the starter culture limited the development of *Enterobacteriaceae* and reduced the microbial diversity compared to that from spontaneous fermentation. KEGG database genes associated with the reduction of acetaldehyde to ethanol, acetyl phosphate to acetate, and 2,3-butanediol to acetoin were most abundant in inoculated samples compared to those in spontaneous fermentation samples. The volatilome profiles were highly consistent with the abundance of the genes; elevated acetic acid, ethyl acetate, and acetoin were observed in the presence of the starters at the end of fermentation. Significant differences were found in the liking of samples based on flavour and odour, suggesting a higher preference by consumers for the spontaneous fermentation samples. Inoculated samples exhibited the lowest scores for the liking data, which were clearly associated with the highest concentration of acetic acid.

REFERENCES

[1] L. Cocolin, D. Ercolini. *Curr. Opin. Food Sci*. **2015**, *2*, 43-50.

[2] V. Alessandria, I. Ferrocino, F. De Filippis, M. Fontana, K. Rantsiou, D. Ercolini, L. Cocolin. *Appl. Environ. Microbiol*. **2016**, *82*, 3988-3995.

[3] I. Ferrocino, A. Bellio, M. Giordano, G. Macori, A. Romano, K. Rantsiou, L. Decastelli. L. Cocolin. *Appl. Environ. Microbiol*. **2018**, *84*, e02120-17.

MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA

Rodríguez Gómez J.M.
Dpto. Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid.
jmrodrig@ucm.es

En los últimos 15 años, varios grupos de investigación han puesto de manifiesto la presencia de bacterias comensales, mutualistas o potencialmente probióticas en la leche humana en condiciones fisiológicas, lo que ha provocado un creciente interés por conocer su microbiota y microbioma y sus posibles funciones para la salud materna y/o infantil.

En general, la microbiota de la leche humana parece estar dominada por bacterias Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus, Streptococcus, Corynebacterium y Propionibacterium*. No obstante, también se pueden aislar con cierta frecuencia diversas bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*...) y bifidobacterias.

Globalmente, se han aislado más de 200 especies bacterianas diferentes, pertenecientes a aproximadamente 50 géneros, a partir de este fluido biológico, incluyendo nuevas especies bacterianas, como *Streptococcus lactarius*. En condiciones fisiológicas, la concentración bacteriana en la leche humana suele oscilar entre 10^1 y 10^3 ufc/mL. El empleo de bombas extractoras puede dar como resultado la presencia de una elevada concentración de bacterias Gram-negativas (*Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*...) y levaduras como consecuencia de su presencia en el agua de lavado o aclarado de las mismas o de prácticas de manipulación poco higiénicas. Los métodos dependientes de cultivo tienen la limitación de no poder evaluar la presencia de microorganismos viables pero no cultivables pero, en cambio, permiten el aislamiento, la conservación y la caracterización de las cepas, incluyendo la secuenciación de los genomas de un número creciente de aislados. En resumen, el uso de métodos de cultivo ha demostrado que la leche humana representa un nicho ecológico complejo y una fuente de cepas con potencial probiótico.

La aplicación de diferentes técnicas moleculares independientes de cultivo ha proporcionado una evaluación complementaria del microbioma de la leche humana. Es importante tener en cuenta que estas técnicas detectan ácidos nucleicos y no células microbianas vivas, lo que significa que el ADN detectado o secuenciado puede pertenecer a organismos vivos o muertos. Otras limitaciones y sesgos que las técnicas moleculares pueden introducir en la evaluación de comunidades microbianas complejas incluyen una sobre- o subestimación de algunos grupos microbianos debido a diferencias en la composición sus paredes celulares, membranas externas o membranas plasmáticas, a los métodos de extracción de ADN, al número de copias del gen diana, a la(s) región(es) del gen 16S rRNA a las que estén dirigidos los cebadores seleccionados y a las limitaciones actuales en lo referente al análisis bioinformático Globalmente, los estudios independientes de cultivo han confirmado la presencia de ADN de géneros bacterianos previamente identificados con técnicas dependientes del cultivo, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*. *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* spp.. Además, algunos de ellos también han descrito la presencia de ADN perteneciente a microorganismos estrictamente anaerobios asociados al intestino (*Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, ...).

Las bacterias de la leche materna, incluyendo anaerobios obligatorios, se transfieren

verticalmente de la madre al lactante a través de la leche materna y juegan un papel importante en la colonización del intestino infantil. Estudios recientes han mostrado que existe un predominio de bacterias transmitidas a través de la leche materna en el intestino de los niños amamantados hasta el destete, incluso si se les introduce alimentos sólidos durante la lactancia materna. Por otra parte, dichas bacterias parecen jugar diversos papeles relevantes para la salud mamaria (prevención de mastitis) y para la salud infantil (protección frente a infecciones, funciones metabólicas, inmunomodulación, neuro-modulación).

El origen de la microbiota mamaria es controvertido pero todos los indicios parecen indicar que ciertas bacterias seleccionadas de la microbiota digestiva materna pueden acceder a las glándulas mamarias a través de una vía oro-entero-mamaria. Aunque se trata de un tema controvertido en la actualidad, algunos estudios han ofrecido una base científica para dicha translocación fisiológica. El mecanismo implicaría a células dendríticas y macrófagos, que serían capaces de captar bacterias no patógenas viables presentes en el lumen del intestino y, posteriormente, llevarlas a otros lugares, incluyendo la glándula mamaria lactante. Cabe recordar que existe un intenso flujo de células inmunitarias intestinales a las glándulas mamarias durante el embarazo y la lactancia.

Existen tres factores que están presentes en las glándulas mamarias durante y al final del embarazo y pueden explicar el tropismo selectivo que la glándula mamaria parece ejercer sobre algunas especies bacterianas maternas durante dicha etapa: (a) existe un estado fisiológico de inmunodepresión con el fin de tolerar el feto; (b) como se ha indicado anteriormente, existe un formidable proceso de angiogénesis; y (c) el pre-calostro comienza a llenar el conducto mamario durante el último tercio del embarazo proporcionando un rico ambiente nutritivo para las bacterias, facilitando así su crecimiento. Se requieren más estudios para elucidar los mecanismos por los cuales algunas cepas bacterianas pueden translocar fisiológicamente en ciertos huéspedes o etapas de la vida. La existencia de tales vías bacterianas oro-entero-mamarias proporcionaría nuevas oportunidades para manipular la microbiota materno-fetal alterada, reduciendo el riesgo de parto prematuro, mastitis o de ciertas enfermedades infantiles.

REFERENCIAS

[1] Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. *Pharmacol. Res.* **2013***; 69*: 1-10.

PRESENTE Y FUTURO DE LA GENÓMICA EN LA MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

Daniel Ramón

Biopolis-Archer Daniels Midland Co.

daniel.ramon@biopolis.es

Como decía Woody Allen, las bacterias, esos seres microscópicos que sólo se visualizan con la ayuda de un microscopio, fueron los primeros habitantes de la tierra y probablemente serán los últimos en abandonarla. No sólo eso, son también los seres vivos más abundantes en el planeta. Calculamos que debe haber del orden de 5 quintillones de bacterias o, lo que es lo mismo, por cada ser humano en el planeta hay casi un trillón y medio de bacterias. Lo más interesante es que buena parte de esa biomasa microbiana vive dentro de nuestro propio cuerpo. Gracias a la aplicación de técnicas de secuenciación genómica masiva, en los últimos años hemos determinado que en nuestro cuerpo hay tantas células nuestras como bacterias pululando en su interior. Son particularmente numerosas en la piel y, sorprendentemente, en el tracto digestivo. Por poner cifras, si pesamos setenta kilos, uno de esos kilos son las bacterias que pueblan nuestro aparato digestivo. De hecho se habla de ellas como de un posible nuevo órgano, un órgano no descrito hasta la fecha y que tiene una relación trascendental con nuestra alimentación. La razón es clara: ese ecosistema bacteriano es el responsable de extraer energía de los alimentos y también de modificar o destruir sustancias que ingerimos y que pueden ser saludables o deletéreas para nuestra salud.

Al conjunto de especies bacterianas que pueblan nuestro tracto digestivo lo llamamos microbioma digestivo. Cada humano tiene su microbioma digestivo particular, aunque en individuos sanos se pueden agrupar en grupos similares que se llaman enterotipos. Nuestro microbioma puede variar en función de la edad, de la dieta, del empleo de fármacos (fundamentalmente antibióticos), o de que padezcamos determinadas patologías. Estos cambios suelen ser reversibles y abren la puerta al desarrollo de nuevos alimentos que contengan bacterias y/o metabolitos capaces de devolver nuestro microbioma a sus condiciones iniciales, o lo modifiquen en un determinado sentido. Por ejemplo, los celíacos tienen un microbioma digestivo diferente con una alta proporción de especies de enterobacterias y menos bifidobacterias o lactobacilos. Esta alteración se denomina disbiosis y es, en cierta medida, responsable de la inflamación intestinal que padecen estos enfermos. En nuestra compañía hemos desarrollado un probiótico que, tal como se ha demostrado en un ensayo clínico con niños celíacos, es capaz de rebalancear su microbioma digestivo, aumentando bifidobacterias y lactobacilos y disminuyendo enterobacterias. La celiaquía no es un caso aislado de microbioma alterado. En obesidad ocurre una situación similar. En este caso, los individuos obesos tienen un aumento de un grupo concreto de bacterias denominado bacteroidetes y un descenso de otro llamado firmicutes. En individuos obesos que siguen regímenes hipocalóricos y adelgazan, ese desbalance se recupera. Varias empresas, entre ellas la nuestra, seguimos la pista de bacterias probióticas que den lugar a respuestas similares. Aun hay más, individuos

con autismo, colitis ulcerosa, dermatitis atópica, diabetes tipo II o psoriasis, entre otras muchas patologías, tienen desórdenes en su microbioma digestivo.

Pero el estudio de microbiomas también se puede aplicar a alimentos y bebidas fermentadas con resultados sorprendentes. Hemos descubierto que lejos de ser ecosistemas con poca carga microbiana, los sustratos animales y vegetales sobre los que los inóculos crecen para producir los derivados fermentados contienen centenares de especies microbianas distintas. Muchas de ellas juegan un papel trascendental en el control del desarrollo de patógenos o en las propiedades organolépticas del producto final. Bajo otro punto de vista, el de la seguridad alimentaria, la genómica puede convertirse en la herramienta del futuro para detectar los primeros estadios de crecimiento de microorganismos alterantes o patógenos.

En resumen, aun queda mucho que estudiar y comprender, pero no hay ninguna duda de que el futuro próximo nos va a brindar muchas más sorpresas en torno al empleo de la genómica en microbiología de alimentos. Cada una de ellas será una nueva oportunidad de desarrollo de nuevos suplementos nutricionales o alimentos especializados de gran valor añadido, tanto social como comercial. Los tecnólogos de alimentos deberemos estar muy atentos a estos avances.

PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA Y EVALUACIÓN DE RIESGOS MICROBIOLÓGICOS EN ALIMENTOS

Antonio Valero

Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus de Rabanales s/n. Edif. Darwin Anexo C1. 14014, Córdoba.

avalero@uco.es

A lo largo de la historia se ha constatado la capacidad que presentan los microorganismos para la transformación de los alimentos dirigiendo procesos donde se modifican factores que influyen sobre su calidad. El comportamiento de los microorganismos en matrices alimentarias está influido por una serie de mecanismos de regulación de su metabolismo que les facilita su reproducción en caso de que estén presentes en un medio favorable, o la regulación de expresión genómica que les permite sobrevivir a condiciones ambientales adversas.

La velocidad a la cual se producen estos cambios y los factores que los generan pueden ser cuantificados y controlados, permitiendo pues la obtención más o menos precisa de las respuestas microbianas frente a unas condiciones específicas en un alimento. El hecho de poder definir matemáticamente las respuestas microbianas es la base a partir de la cual surge la *microbiología predictiva* que constituye una valiosa herramienta para poder cuantificar la ecología microbiana de los alimentos. En los últimos años han existido progresos sustanciales gracias a un trabajo multidisciplinar por parte de investigadores en relación con la microbiología de alimentos y desarrollo de modelos matemáticos. Desde los modelos cinéticos de crecimiento e inactivación microbiana la microbiología predictiva ha ido evolucionando hacia distintas líneas de investigación orientadas al estudio de condiciones de pre-incubación, modelos que estiman el comportamiento de células individuales, modelos de probabilidad, estocásticos o de transferencia microbiana.

Sin embargo, recientemente ha surgido un interés en conocer las respuestas a nivel genómico y cómo influyen sobre el comportamiento microbiano. El desarrollo de enfoques basados en la biología de sistemas permite la aplicación de modelos de índole más mecanicista que conduzcan a la obtención de respuestas microbianas más precisas [1]. Los modelos a escala genómica se construyen a partir de datos información procedente de estudios del análisis del flujo metabólico dinámico, metagenómica, proteómica y metabolómica. En la Figura 1 se representan los modelos conocidos como "Top down" o inductivo (a partir del conocimiento del sistema se puede inferir qué componentes son los más críticos) y "Bottom up" o deductivo (a partir de las propiedades de los componentes se deduce el comportamiento del sistema).

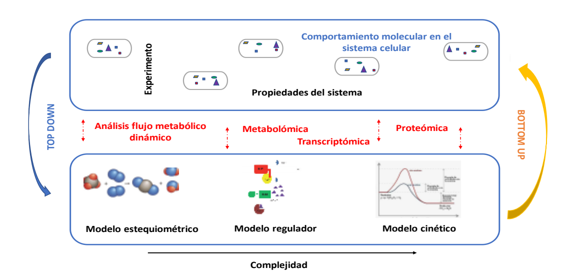


Figura 1. Enfoques "Top down" o inductivo y "Bottom Up" o deductivo para la aplicación de modelos de biología de sistemas (Adaptado de [2])

Por otro lado, la creciente preocupación por la mejora y armonización de las políticas de inocuidad alimentaria es hoy en día uno de los principales desafíos en un sector agroalimentario cada vez más globalizado [2]. Para ello, la adopción de enfoques basados en la Gestión Cuantitativa del Riesgo

Microbiológico está siendo adoptada por parte de las industrias como parte de su sistema de calidad, siguiendo las indicaciones del Codex [3]. La estimación del riesgo microbiológico requiere una evaluación previa del conocimiento generado a través de metodologías estadísticas y computacionales y la interpretación de los resultados mediante el desarrollo y aplicación de recursos disponibles (bases de datos y herramientas informáticas) para ser utilizados por los asesores y gestores del riesgo [4].

Las numerosas aplicaciones de los modelos matemáticos están orientadas hacia la identificación de peligros y establecimiento de medidas de control en el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), determinación de la vida comercial o diseño de nuevos procesos y/o productos entre otras (Figura 2) [5].



Figura 2. Principales herramientas de microbiología predictiva y evaluación de riesgos microbiológicos. Fuente: https://foodrisklabs.bfr.bund.de/microbial-modeling-exchange-wiki/

Los últimos avances en el área de la microbiología predictiva y evaluación de riesgos microbiológicos fueron expuestos en el último evento celebrado en Córdoba (septiembre 2017) de la "*International Conference on Predictive Modelling in Food (ICPMF)*".

El conocimiento de las bases moleculares y la integración de la información generada en los modelos "macroscópicos" y herramientas informáticas constituye uno de los mayores desafíos a afrontar en los próximos años. La utilización de los modelos predictivos como herramientas que asistan en la toma de decisiones por parte de los asesores y gestores del riesgo microbiológico debe contribuir a la necesaria armonización de las políticas de inocuidad alimentaria.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento al Comité Organizador del congreso por haberme invitado a impartir esta conferencia de clausura. Asimismo, el grupo HIBRO (PAIDI AGR-170) de la Universidad de Córdoba ha contribuido al desarrollo de mi trayectoria docente e investigadora.

REFERENCIAS

[1] Brul, S., Mensonides, F.I.C., Hellingwerf, K.J., Teixeira de Mattos, M.J. *Int. J. Food Microbiol.* **2008,** *128*, 16-21.

[2] Bruggeman, F.J., Westerhoff, H.V. *J. Biol. Phy.*, **2006,** *32*, 273-288.

[3] Fung, F., Wang, H.S., Menon, S. *Biom. J.*, **2018,** *41*, 85-95.

[4] Codex Alimentarius Commission. www.codexalimentarius.net/download/standards/10741/CXG_063e.pdf, **2007,** Acceso: julio/2018.

[5] Membré, J.M., Guillou, S. *Curr. Opin. Food Sci.*, **2016**, *8*, 120-126.

[6] Tenenhaus-Aziza, F., Ellouze, M. *Food Microbiol.* **2015,** *45*, 290-299.

SESIONES TEMÁTICAS

SESIÓN 1A. BEBIDAS FERMENTADAS ALCOHÓLICAS

MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE LAS LEVADURAS A LOS PROCESOS FERMENTATIVOS Y SUS POSIBLES APLICACIONES

Querol A. [1]; **Alonso-del-Real J.**[1]; **Lairón-Peris M**[1]; **Minebois R.**[1]; **Pérez-Torrado R.**[1]; **Barrio E.** [1,2]

1 IATA (CSIC)/Departamento de Biotecnología los Alimentos. C/ Catedrático Agustín Escardino Benlloch, 7 46980 Paterna, Valencia (España)

2 Universitat de València/Departament de Genètica. C/ Doctor Moliner, 50 46100 Burjassot – Valencia (España).

aquerol@iata.csic.es

En pleno siglo XXI, la industria enológica debe dar respuesta a los retos planteados tanto por las nuevas demandas del consumidor como por la modificación de las propiedades de la materia prima, el mosto de uva, debidas al cambio climático, lo que tiene importante repercusión en la calidad y aceptación del producto final, el vino. Para ello se exigen cambios en las prácticas enológicas entre las que tiene un papel muy relevante el desarrollo de cultivos iniciadores de levaduras adaptadas a las nuevas condiciones de fermentación como son las bajas temperaturas para obtener vinos más aromáticos o el desarrollo de levaduras que produzcan más aromas, mayor concentración de glicerol y menos etanol, estas dos últimas demandas asociadas al cambio climático.

S. cerevisiae se ha descrito como la especie predominante en la fermentación alcohólica; sin embargo, otras especies del género *Saccharomyces* también pueden tener un papel importante en procesos de fermentación. Trabajos previos del grupo, han estudiado las características fisiológicas de interés enológico que presentan las especies *S. uvarum* y *S. kudriavzevii* respecto a cepas de *S. cerevisiae*, así como de los híbridos de estas especies (1, 2). A pesar de que durante la fermentación vínica no se dan las condiciones óptimas de crecimiento para las levaduras, las levaduras vínicas de la especie *S. cerevisiae* son organismos muy especializados que ha evolucionado bajo las restrictivas condiciones ambientales presentes en la vinificación por lo que se han visto sometidas a fuertes presiones selectivas durante el proceso de adaptación a estos ambientes manipulados por el hombre (3). Sin embargo, estas especies no están adaptadas también a fermentaciones vínicas pero al igual que sus híbridos están mejor adaptadas a crecer a bajas temperaturas que las cepas víncias de *S. cerevisiae* (4). Nuestro grupo ha descrito distintos mecanismos asociados a esta selección, también conocida como domesticación inconsciente, o a los mecanismos moleculares que están implicados en algunas de las diferencias fenotípicas o metabólicas entre las especies S. cerevisiae, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum* y sus híbridos. Algunos de estos estudios se resumen a continuación.

Reordenaciones genómicas implicadas en la resistencia a sulfito

El sulfito (SO_3^{2-}) se ha utilizado desde tiempos remotos en la elaboración del vino como conservante debido a sus propiedades antibacterianas. Esto ha provocado que las levaduras vínicas se hayan adaptado al crecimiento en mostos con altos niveles de sulfito. Uno de los principales factores que confieren resistencia a sulfito en la levadura *S. cerevisiae* es el gen *SSU1* que codifica una bomba transportadora de sulfito y nitrato

localizada en la membrana plasmática. Nuestro grupo participó en la descripción de una translocación recíproca entre los cromosomas VIII y XVI que modificaba el promotor del gen *SSU1* lo que le confería una expresión constitutiva de *SSU1* y, por tanto, una mayor resistencia al sulfito (5). Recientemente hemos observado nuevos sucesos de reordenaciones cromosómicas implicadas en la tolerancia al SO_2 al secuenciar genomas de cepas de *S. uvarum*, que nos han permitido describir dos nuevas translocaciones que afectan a la expresión de *SSU1*, pero estas translocaciones sólo se encuentran en cepas vínicas y de sidra, pero no en cepas silvestres. La presencia de mecanismos moleculares que dan como resultado una convergencia fenotípica, refuerza el enorme papel adaptativo que tiene la sobreexpresión de *SSU1* en cepas industriales (Gutiérrez et al., en revisión).

Conversión génica ectópica implicada en la mayor eficiencia de la fermentación alcohólica.

Otro mecanismo observado en levaduras vínicas mediante estudios de genómica comparada realizado por nuestro grupo corresponde a los genes de las alcohol deshidrogenasas, enzimas responsables de la síntesis y asimilación de etanol, claves en la fermentación alcohólica. Pudimos observar que las cepas vínicas de *S. cerevisiae* presentan fijado un alelo del gen *ADH2*, que deriva de una conversión génica de una región del gen *ADH2* por *ADH1*, dando como resultado una baja afinidad por el etanol, similar al de la alcohol deshidrogenasa 1.

Presencia de levaduras híbridas naturales entre especies del género *Saccharomyces*

La hibridación interespecífica y la introgresión han tenido un papel importante en la evolución adaptativa de las levaduras del género *Saccharomyces* a procesos fermentativos (Guillamón and Barrio, 2017). Ambos mecanismos se pueden considerar equivalentes a una transferencia horizontal de genes entre especies próximas, ya que se forman individuos con dos conjuntos de genes provenientes de especies diferentes, que pueden presentar diferencias funcionales. Nuestro grupo demostró que la hibridación interespecífica espontánea ha sido un importante mecanismo para generar cepas de levaduras con ventajas selectivas en ambientes fluctuantes, ya que presentan las propiedades de ambos parentales (1). El desarrollo de híbridos artificiales entre estas especies o entre cepas de *S. cerevisiae* ha resultado de gran interés para resolver algunas de las demandas del sector (6, 7, Lairon, enviado) que incluso nos ha permitido desarrollar cepas comerciales en colaboración con la empresa Lallemand.

Por último, hemos estudiado los mecanismos por los que *S. cerevisiae* es dominante en una fermentación vínica y como afecta la presencia de especies como *S. uvarum* y *S. kudriavzevii* en el metabolismo de *S. cerevisiae* (Alonso-del-Real et al., enviado).

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos: Proyectos AGL2015-67504-C3-1-R y AGL2015-67504-C3-3-R to A.Q. y E.B. respectivamente

REFERENCIAS

[1] R Pérez-Torrado, E Barrio E, A Querol. A. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2018,** *58*(11),1780-1790

[2] A Querol, R Pérez-Torrado, J Alonso-Del-Real, R. Minebois, J Stribny, BM Oliveira, E. Barrio. *Adv Food Nutr Res*, **2018**, *85*, 177-210.

[3] JM Guillamón, E Barrio. *Front Microbiol*, **2017**, *8*, 806.

[4] J Alonso-del-Real, M. Lairón-Peris, E. Barrio E, A Querol, *Front Microbiol*, **2017**, *8*, 150.

[5] JE Pérez-Ortín, A Querol, S Puig, E Barrio E, *Genome Res*, **2002**, *12*, 1533-1539.

[6] L Pérez-Través, CA Lopes, E Barrio, A Querol, *Int J Food Microbiol*, **2012**, *156*, 102-111.

[7] L Pérez-Través, CA Lopes, R González, E Barrio, A Querol, *Int J Food Microbiol*, **2015**, *205*, 30-40.

MECHANISMS OF ADAPTATION IN YEAST TO INDUSTRIAL FERMENTATIONS

García-Ríos Estéfani[1], Nuévalos Marcos[1], Barrio Eladio[1,2], Puig Sergi[1], Guillamón José Manuel[1]

1 Institute of Agrochemistry and Food Technology-CSIC (Spain)

2 University of Valencia (Spain)

e.garcia.rios@iata.csic.es

Cells respond to environmental and/or genetic changes in order to survive and proliferate. Characterization of the changes after the stresses at different -omics levels is crucial to understand the adaptation of yeast to the changing conditions. Genome-wide analysis extends our understanding of cellular physiology by pointing out the mechanisms that play role in sensing the stress caused by those perturbations (temperature, ethanol, sulfites, nitrogen…) and related signaling pathways [1-5]. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system has been studied in response to industrial stresses and the changes at different cellular levels (transcriptomic, proteomic, and metabolomics) were followed either statically or/and dynamically, short and long term.

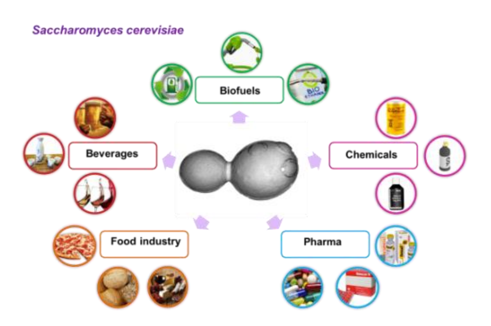


Figure 1: Industrial processes related with *S. cerevisiae.*

Yeast undergoes considerable stress during wine fermentation from high concentrations of sugars in grape must, which leads to high osmotic pressure at the beginning of the process. As fermentation proceeds, ethanol accumulation, limiting nitrogen concentration, or even the presence of SO_2, impose further pressure.

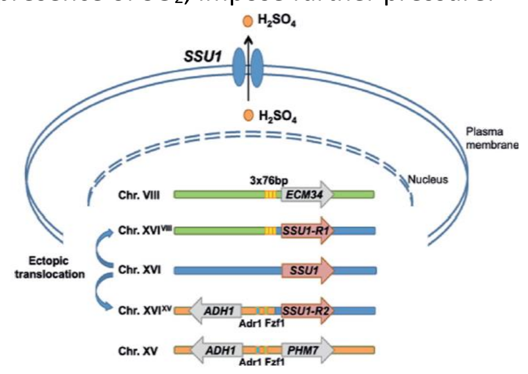
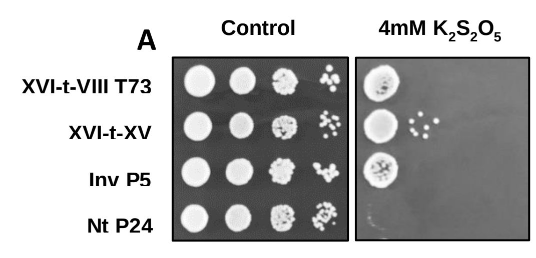


Figure 2: Mechanisms of sulfite resistance through reciprocal translocations. Adapted from [6].

Adaptation by natural selection occurs through the emergence of mutations that improve the fitness of an organism and its reproductive success in its environment. Small insertions and deletions (INDEL) that generate frame shifts may affect also the integrity of proteins, causing drastic trait changes [7]. Larger genome reorganizations may also drive the emergence of more adapted cells. Yeasts, especially the *Saccharomyces* genus, have been widely investigated for their genome plasticity and several examples of chromosomal rearrangements conferring a phenotypic advantage to individuals have been found [4,5,8,9]. The large number of chromosomal rearrangements found among yeast strains and their striking physiological consequences suggest that other unidentified translocation events may impact on the adaptation of wild yeast to their ecological niche.

By analyzing the genomic sequence of an industrial *S. cerevisiae* strain [2] we bring to light a new chromosomal rearrangement involving the gene *SSU1* that confers an adaptive advantage to yeast strains in high sulfite concentrations.



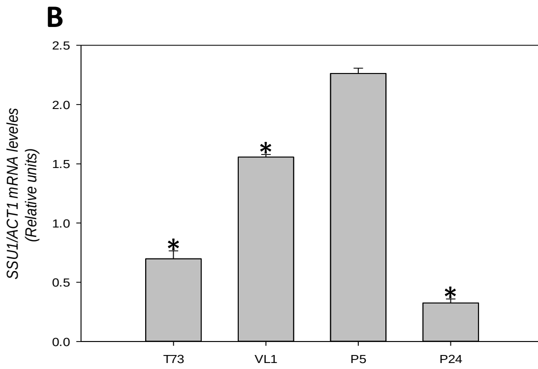
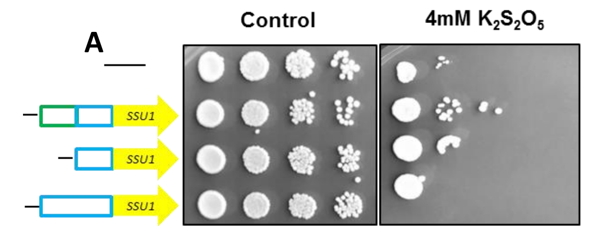


Figure 3: Comparison of yeast strains holding different chromosomal rearrangements in *SSU1* gene. **A:** Drop assays of the different strains depending on the different concentrations of $K_2S_2O_5$. **B:** Expression levels of *SSU1* after 6 h of growth in YPD+TA obtained from real-time PCR standardized with the constitutive gene *ACT1*. * Indicates significant differences (*p*-value≤0.05) compared to P5.

In the spot assays we observed that the strains T73 and VL1, which present the translocations VIII-t-XVI and XV-t-XVI, respectively, and the strain P5 with the new rearrangement on chromosome XVI, were more resistant to increasing concentrations of sulfites than P24 strain (control without rearrangements). In order to find the mechanism responsible for the phenotypic differences, the basal expression levels of *SSU1* in the absence of $K_2S_2O_5$ were measured. Fig. 1B shows that strain P5 had higher *SSU1* expression levels compared to the other strains.

We have tested the sulfite resistance generated by the inv-XVI *SSU1* by cloning it into the plasmid pRS416 and introducing the different constructions into different genetic backgrounds. The strains transformed with inserts from P5 presented better resistance than the wild type construction and empty plasmid.



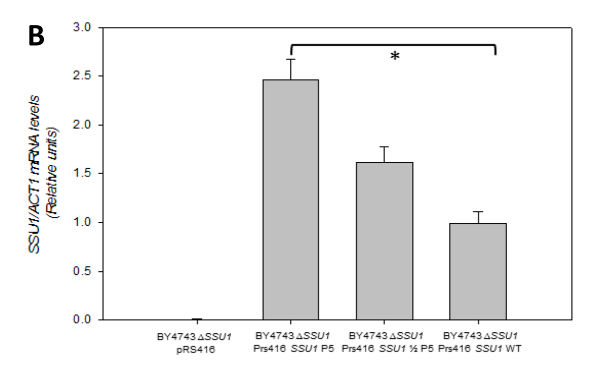


Figure 4: **A:** Phenotypic effect in the resistance to $K_2S_2O_5$ of the different constructions in the BY4743 Δ*SSU1* strain. **B:** Expression levels of *SSU1*. *Indicates significant differences (*p*-value≤0.05) compared to the empty control

REFERENCES

[1] García-Ríos, E., López-Malo, M., and Guillamón, J. M. *BMC Genomics,* **2014**, *15*, 1059.

[2] García-Ríos, E., Morard, M., Parts, L., Liti, G., and Guillamón, J. M.. *BMC Genomics,* **2017**,*18*, 159.

[3] Gasch, A. P. “The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses,” in *Yeast Stress Responses* (Springer Berlin Heidelberg), **2003**, 11–70.

[4] Pérez-Ortín, J. E., Querol, A., Puig, S., and Barrio, E. *Genome Res.*, **2002**, *12*, 1533–9.

[5] Zimmer, A., Durand, C., Loira, N., Durrens, P., Sherman, D. J., and Marullo, P. *PLoS One,* **2014,** *9*, 37–39.

[6] Marsit, S., and Dequin, S. *FEMS Yeast Res.*, **2015**, *15*, 1–12.

[7] Doniger, S. W., Kim, H. S., Swain, D., Corcuera, D., Williams, M., Yang, S. P., et al. *PLoS Genet.,* **2018**, *4*.

[8] Guillamón, J. M., and Barrio, E. *Front. Microbiol.*, **2017**, *8*, 1–20.

[9] Marsit, S., Mena, A., Bigey, F., Sauvage, F. X., Couloux, A., Guy, J., et al. *Mol. Biol. Evol.,* **2015**, *32*, 1695–1707.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DETERIORANTE DE BACTERIAS LÁCTICAS PRESENTES EN UNA CERVECERÍA ARTESANAL

Rodríguez-Saavedra Magaly, García-González Celia, González de Llano Dolores, Moreno-Arribas M. Victoria

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, c/ Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, España.

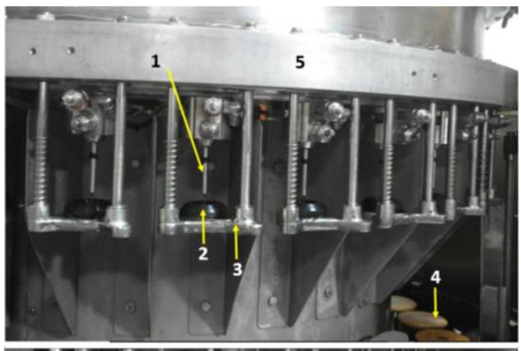
magaly.rodriguez@estudiante.uam.es, victoria.moreno@csic.es

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son las principales causantes del deterioro de la cerveza debido a la producción excesiva de ácido láctico, diacetilo y turbidez, pudiendo ocasionar que ésta sea imbebible, lo que origina considerables pérdidas económicas. Las cervezas artesanales son más susceptibles al deterioro ya que normalmente se comercializan sin filtrar y pasteurizar.

El objetivo de este estudio es identificar y evaluar la capacidad deteriorante de las BAL presentes en el proceso productivo de una cervecería artesanal, después de la limpieza y sanitización.

Se ha seleccionado una fábrica que elabora más de 15 marcas/variedades de cerveza en su producción, diferentes a los estilos “sour” y “lambics”; la cual utiliza levadura cervecera del género *Saccharomyces spp.* para la fermentación del mosto, considerándose la presencia de BAL como una potencial fuente de contaminación en los procesos de producción y en el producto final.

Para la toma de muestras, se ha tenido en cuenta las zonas con mayor probabilidad de contaminación primaria o secundaria, seleccionándose los puntos más críticos. Se tomaron 60 muestras que incluyen la monitorización ambiental, hisopados de superficie de equipos y accesorios (Fig. 1), productos intermedios, cerveza embotellada y producto terminado del almacén. Después del cultivo y aislamiento, se lograron identificar 15 aislados mediante pruebas morfológicas, fenotípicas, bioquímicas y por espectrometría de masas MALDI-TOF Biotyper.



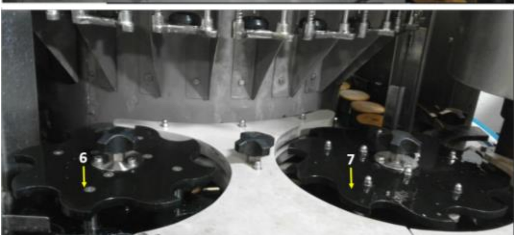


Figura 1. Puntos de hisopado en máquina llenadora de botellas, donde 1: tubo de llenado, 2: tulipa, 3: portatulipa, 4: portabotella, 5: condensado en llenadora, 6: estrella de ingreso a llenadora y 7: estrella de ingreso a coronador.

Las principales especies bacterianas detectadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, estando la mayoría de ellas presentes en zonas que podrían ocasionar una contaminación indirecta como lo son las estrellas de la máquina llenadora de botellas.

Para estudiar la capacidad alterante de la cerveza, se indujo a las bacterias a crecer en medios con concentración de lúpulo y etanol en forma creciente, con el objetivo de simular el proceso de adaptación de las mismas al ambiente cervecero y de seleccionar a los aislados más resistentes. Así mismo, se utilizó una bacteria de referencia procedente de una cervecería de gran escala, que se caracteriza por ser lúpulo resistente.

Con los aislados que lograron adaptarse, se evaluó la capacidad deteriorante a través de su crecimiento microbiano (placas de 96 pocillos) en cervezas estériles con diferentes unidades de amargor (IBU), porcentajes de etanol (0,5-12% ABV) y en el rango de pH de 3,25 a 5,0. Todos los aislados estudiados crecieron en el rango de pH de 4,25 a 5,00 y a bajos porcentajes de alcohol, lo que demuestra la susceptibilidad microbiana de las cervezas sin alcohol (<0,5%) en la producción artesanal. *L. brevis* creció incluso a pH 3,25 así como, a elevados IBUs y a altas concentraciones de etanol. Por lo que esta bacteria podría causar un deterioro incluso en cervezas ácidas o “sour beer”, cervezas con alto amargor como las Indian Pale Ale “IPA” y cervezas con altos porcentajes de etanol como las “Eisbock”.

Por otro lado, se estudió la capacidad alterante de estos aislados en cerveza embotellada en fábrica. La inoculación se realizó previo al coronado de las botellas. Este estudio permite evaluar el desarrollo microbiano en condiciones reales de un producto envasado en planta, ya que tiene en cuenta la presencia de levadura activa, concentración de CO_2 y la presión dentro de la botella. Las botellas, fueron mantenidas a 25 °C simulando las condiciones de almacenamiento y transporte del producto y los análisis se realizaron en el día 5 y 15, simulando los días de cuarentena del producto en el almacén, en el primer caso y en el segundo simulando la presencia del producto en el mercado. Se evaluó el crecimiento microbiano, los cambios en los parámetros fisicoquímicos como pH, y de acidez total expresada en porcentaje de ácido láctico, y la generación de metabolitos bacterianos relevantes para las características sensoriales de la cerveza, entre los que se incluye el ácido acético por HS-SBSE (Headspace Stir Bar Sorptive Extraction) acoplada a Cromatografía de Gases con detección por Espectrometría de masas (GC/MS). El aislado *L. brevis* produjo el mayor descenso de pH, notable incremento en la concentración de ácido acético y de la acidez total, detectándose incluso en el día 5.

Lactobacillus brevis aislada del ambiente cervecero artesanal, fue la especie bacteriana que mostró mayor capacidad deteriorante, llegando a producir una turbidez visualmente detectable y a deteriorar cervezas aparentemente con menor riesgo microbiológico como las de estilo IPA.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del MINECO (AGL2015-64522-C2-1-R-).

REFERENCIAS

[1] G. Menz, C. Andrighetto, A. Lombardi, V. Corich, P. Alfred, F. Vriesekoop, *J. I. Brewing*, **2010**, *116* (1), 14-22.

[2] C. Garofalo, A. Osimani, V. Milanović, M. Taccari, L. Aquilanti, F. Clementi, *J. Food Sci.*, **2015**, *80*, M2845-M2852.

[3] D. Matoulková, P. Kubizniaková, *Kvasny Prum.*, **2015**, *61* (3), 76-88.

[4] L. Rodhouse, F. Carbonero, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2017**, *14*, 1-12.

EL TRANSCRIPTOMA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* REVELA ROLES CLAVE DE LA MELATONINA EN LA DEFENSA CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO

Vázquez J., Sunyer-Figueres M., Mas A., Torija MJ., Beltran G
Universitat Rovira i Virgili/Dept. Bioquímica i Biotecnologia. C/ Marcel·lí Domingo, 1. 43007, Tarragona
merce.sunyer@urv.cat

Introducción
La melatonina (N-acetil-5-methoxi-triptamina; MEL) es una molécula bioactiva que se encuentra en casi todos los seres vivos y destaca por su implicación en una gran variedad de funciones fisiológicas, de entre las cuales destaca su actividad antioxidante. Recientemente, se ha descrito que las levaduras sintetizan MEL durante la fermentación alcohólica [1, 2], pudiendo estar relacionada con la protección celular frente al estrés oxidativo al que están sometidas durante este proceso [3]. Esta actividad antioxidante puede ser tanto directa -neutralizando especies reactivas de oxígeno (ROS)- como indirecta -activando el sistema enzimático de defensa [3].
S. cerevisiae es capaz de reaccionar a las condiciones adversas regulando distintos procesos biológicos tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. Para conocer el mecanismo de acción de la MEL frente al estrés oxidativo, analizamos la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* en presencia y ausencia tanto de MEL como de estrés oxidativo.

Materiales y Métodos
En este estudio se usó la cepa de *S. cerevisiae* QA23 (Lallemand). A partir de un pre-cultivo de 24 h (28ºC, 120rpm) en medio rico YPD (2% (w/v) glucosa, 2% (w/v) peptona y 1% (w/v) extracto de levadura), se inoculó una concentración de $5x10^3$ cel/mL en 50 mL de YPD suplementado (Mel) o no (0) con 5 µM de MEL. Cuando el cultivo llegó al inicio de la fase exponencial ($5x10^6$ cel/mL), se indujo estrés oxidativo con 2 mM de H_2O_2 durante 1 h (MelH y H). Se incubaron dos condiciones sin estrés (Mel y 0). Para el posterior análisis transcriptómico se lavaron las células con PBS y se congelaron a -80ºC.
Se usó Trizol Plus RNA Purification Kit de Ambion Life Technologies para extraer el RNA. Los niveles de expresión génica se determinaron mediante un análisis transcriptómico global usando “Yeast Gene Expression Microarray” con 6256 sondas de *S. cerevisiae* (Agilent Technologies). El análisis estadístico se hizo con Gene Spring Software v. 13.1.1 de Agilent Technologies, considerando con expresión diferencial genes con p-values<0.05. A partir de estos resultados se determinaron las funciones moleculares, procesos celulares, componentes celulares y vías relacionadas con los genes significativos de cada comparación usando Gene Ontology (CC-BY 4.0) [4] y KEGG pathway mapping database [5]. Además, se determinó la expresión génica de algunos genes con PCR cuantitativa para comprobar los resultados obtenidos [3]. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

Resultados y Discusión
En este estudio se evaluaron los efectos de la MEL en la expresión génica de *S. cerevisiae* en presencia y ausencia de estrés oxidativo. Los cambios transcriptómicos más significativos se observaron cuando se aplicó estrés oxidativo independientemente de la presencia de MEL (MelH vs Mel, 3889 y H

vs 0, 4254). La MEL en ausencia de H_2O_2 modificó la expresión de 21 genes (Mel vs 0), mientras que la MEL en células expuestas a H_2O_2 fue capaz de modificar 777 genes (MelH vs H) (Figura 1).

Los genes modificados por la MEL en células no estresadas fueron relacionados sobre todo con el transporte y la detoxificación de iones, en la respuesta a estrés y con la actividad oxidoreductasa.

El análisis de funciones moleculares, procesos biológicos, vías metabólicas y componentes celulares relacionadas con los genes activados en la comparación MelH respecto H sugieren que la MEL tiene una alta incidencia en la actividad antioxidante y en la función mitocondrial, aparte de influir en otros procesos, como el metabolismo lipídico, los transportadores de membrana, la señalización y el crecimiento filamentoso.

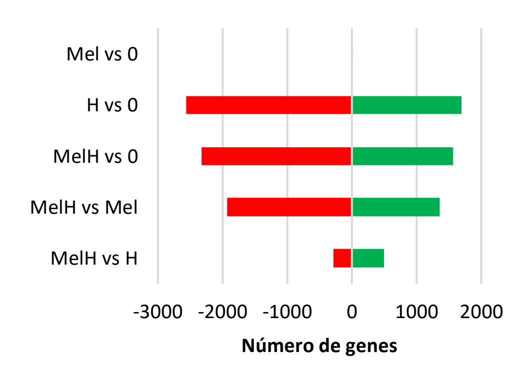


Figura 1: Número de genes expresados diferencialmente entre distintas condiciones (fold change ≥1; p-value <0,05). En rojo, genes reprimidos, en verde, genes activados.

La activación de genes con función antioxidante por parte de la MEL se ha visto incluso en células no estresadas, cosa que sustenta su papel antioxidante demostrado en otros artículos [3]. Esta molécula parece proveer a la célula de una maquinaria eficiente para mantener un ambiente reducido, no solo sobreexpresando genes implicados en el incremento de la actividad de enzimas antioxidantes y promoviendo la síntesis de otros antioxidantes, sino también influyendo en vías relacionadas con la tolerancia a estrés oxidativo.

La cadena respiratoria mitocondrial es la principal fuente de ROS, y también el principal sitio para su detoxificación [6] por lo tanto, su función es requerida para la resistencia a estrés oxidativo en levaduras [7]. Nuestros resultados sugieren que la mitocondria puede ser la diana de la MEL (como parece que es en humanos [8]), ya que es capaz de modularla a nivel transcripcional, activando no solo genes relacionados con la cadena respiratoria y la ATPasa, sinó también otros relacionados con el mantenimiento y función de la mitocondria.

Este estudio ha permitido ampliar nuestro conocimiento sobre el rol de la MEL frente al estrés oxidativo en levaduras, analizando su respuesta a nivel transcripcional.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el Ministerio de Economía y Competitividad, España (Proyectos ALG2013-47300-C3-1-R y ALG2016-77505-C3-3-R), por el apoyo económico. Este artículo ha sido posible con el apoyo de la Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya, de la Unión Europea (UE) y del Fondo Social Eurpoeo (FSE) 2017FI_B_00607.

REFERENCIAS

[1] MI Rodríguez-Naranjo, MJ Torija, A Mas, E Cantos-Villar, MDC Garcia-Parrilla, *J. Pineal Res.*, **2012**, *53(3)*, 219-224.

[2] E Fernández-Cruz, MA Álvarez-Fernández, E Valero, AM Troncoso, MC García Parrilla, *Food Chem.*, **2017**, *217*, 431-437.

[3] J Vázquez, B González, V Sempere, A Mas, MJ Torija, G Beltran, *Front. Microbiol.*, **2017**, *8(JUN)*, 1-14.

[4] www.yeastgenome.org Accessed:

[5] M Kanehisa, Y Sato, M Kawashima, M Furumichi, M Tanabe, Nucleic Acid Res, 2016, 44, D457-D462.

[6] C Chevtzoff, ED Yoboue, A Galinier, L Casteilla, B Daignan-Fornier, M Rigoulet […], *J. Biol. Chem*, **2010**, *285*, 1733-1742.

[7] MC Grant, FH MacIver, IW Dawes, *FEBS Lett*, **1997**, *410*, 219-222.

[8] RJ Reiter, S Rosales-Corral, DX Tan, MJ Jou, A Galano, B Xu, *Cell. Mol. Life Sci.*, **2017**, *74(21)*, 3863-3881

LA INTERACCION CON *M. pulcherrima* PROMUEVE UNA RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL QUE RECUERDA AL EFECTO CRABTREE EN *S. cerevisiae*

Tronchoni J., Mencher A., Curiel J.A., Morales P., González R.
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-Universidad de La Rioja-Gobierno de La Rioja)
jordi.tronchoni@icvv.es

En un esfuerzo por diferenciarse de sus competidores, la industria vitivinícola está incorporando las levaduras no-*Saccharomyces* como cultivos iniciadores, permitiendo que por primera vez exista más de una especie mayoritaria coexistiendo durante la fermentación. Nuestro laboratorio está interesado en estudiar los efectos transcriptómicos derivados del co-cultivo. Hemos mostrado como estas levaduras no-*Saccharomyces* influyen sobre el transcriptoma de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones anaeróbicas (mayor parte de la fermentación) [1] y aeróbicas (arranque de la fermentación) [2]. La co-inoculación produce de forma general una respuesta relacionada con la absorción de glucosa y la glicólisis, el metabolismo lipídico de membrana, la pared celular y el uso de fuentes alternativas de nitrógeno [1,2].
Como puede observarse en la Figura 1, el transcriptoma de *S. cerevisiae* responde de forma diferente al co-cultivo con diferentes especies de levadura, en concreto, *M. pulcherrima* muestra la respuesta más particular de las observadas hasta ahora.

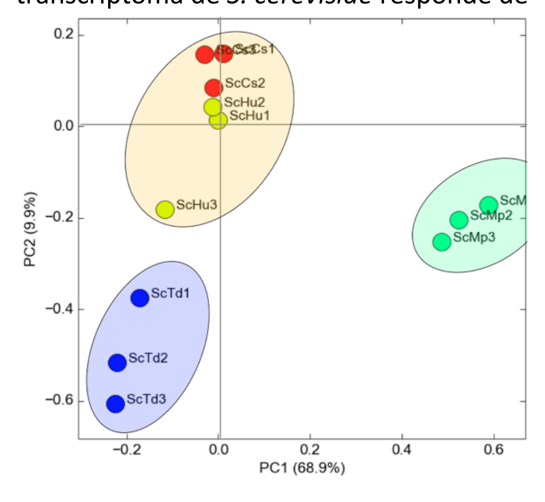


Figura 1: PCA de las diferentes respuestas transcripcionales de *S. cerevisiae* al co-cultivo con *H. uvarum* (Hu), *T. delbrueckii* (Td), *C. sake* (Cs) o *M. pulcherrima* (Mp).

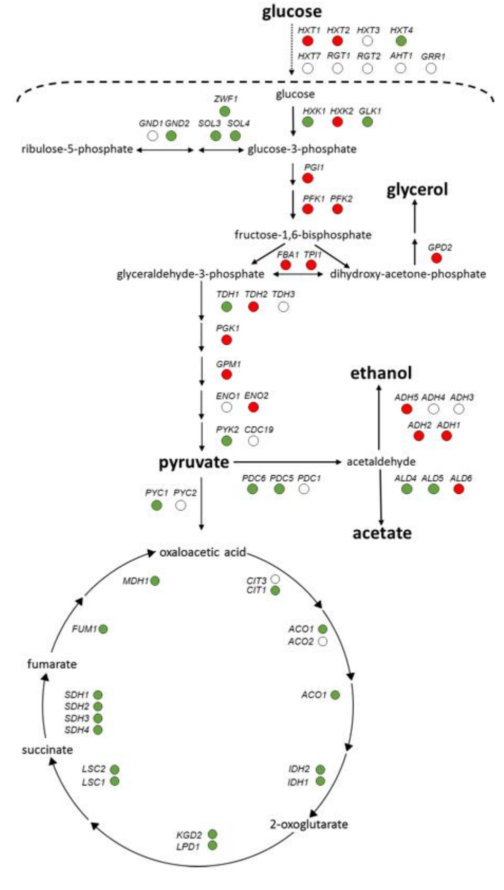


Figura 2: Diagrama de la ruta gluco-fermentativa de *S. cerevisiae* mostrando el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la ruta hacia la síntesis de glicerol y la ruta hacia las pentosas fosfato mediante la Ribosa – 5 fosfato R5P. En rojo se muestran los genes significativamente sobre-expresados, en verde, los infra-expresados.

Esta levadura con alta eficiencia respiratoria, genera el incremento en la expresión génica de la glicolisis más clara y significativo que hemos observado hasta ahora, en una respuesta que recuerda al estudiado efecto metabólico Crabtree, ya que la variación de la expresión génica se observa en las mismas rutas con las que este efecto esta relacionado.

El co-cultivo con *M. pulcherrima* promueve la sobreexpresión de la ruta de la gluco-fermentación al mismo tiempo que se reduce la expresión de genes relacionados con la respiración aeróbica y la cadena de transporte de electrones, el aumento de la ruta de biosíntesis *de novo* de purinas, la disminución de la expresión génica de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato o el descenso en la asimilación de sulfato (Figura 2). Este último probablemente debido a la disminución del estrés oxidativo derivado de la bajada de la respiración.

Una de las primeras hipótesis es que los altos requerimientos de oxígeno disuelto que posee *M. pulcherrima* serían una posible causa de la reconfiguración transcripcional que observamos en *S. cerevisiae*.

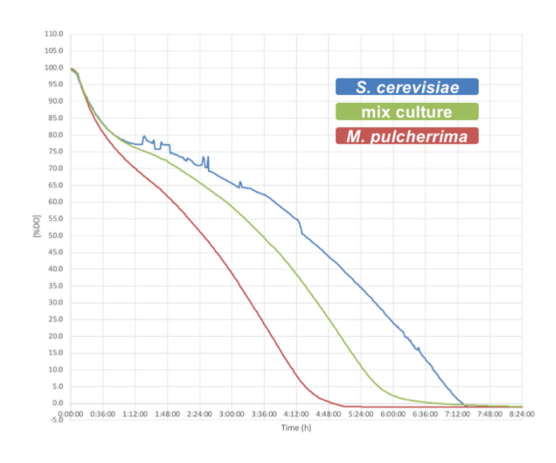


Figura 3: Requerimientos de oxígeno disuelto de *S. cerevisiae* y *M. pulcherrima* en cultivos en solitario o mixtos.

A pesar de que las diferencias en oxígeno disuelto no parecen demasiado altas entre el cultivo mixto y solitario de *S. cerevisiae* no podemos descartar que la diferencia que se observa en la Figura 3 pueda explicar el cambio transcripcional que se observa en *S. cerevisiae* en las condiciones del ensayo.

Este último trabajo apoya los resultados de los anteriores co-cultivos, en los que ya se observaba una estimulación de la actividad metabólica de *S. cerevisiae* en respuesta al cultivo mixto, aunque no de forma tan contundente. Los requerimientos nutricionales específicos de las diferentes especies que convivan con *S. cerevisiae* en los cultivos iniciadores mixtos, así como las condiciones de cultivo (aeróbicas o anaeróbicas), tendrán por tanto un efecto en *S. cerevisiae* que necesita ser entendido para anticipar las posibles consecuencias que estos tengan en la fermentación vínica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2015-63629-R; PhD AM; PostDoc JAC).

JT está financiado por la Fundación General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas a través del programa COMFUTURO.

REFERENCIAS

[1] Tronchoni, J., Curiel, J. A., Morales, P., Torres-Pérez, R., & Gonzalez, R. *Int J Food Microbiol*, **2017**, *241*, 60-68.

[2] Curiel, J. A., Morales, P., Gonzalez, R., & Tronchoni, J. *Front Microbiol*, **2017**, *8*, 2121.

USO DE LEVADURAS KILLER Y SENSIBLES DE *Torulaspora delbrueckii* EN LA ELABORACIÓN DE VINO BASE Y CAVA

Velázquez Rocío[1], Zamora Emiliano[2], Franco María L.[2], Ramírez Manuel[1].
1 Universidad de Extremadura/ Facultad de Ciencias/ Departamento de Ciencias Biomédicas /Área de Microbiología. Avda de Elvas s/n, Edificio Antiguo Rectorado, 06071 Badajoz.
2 Junta de Extremadura / Estación Enológica. 06200 Almendralejo.
rociovelazquez@unex.es

Resumen. Las estirpes killer de *Torulaspora delbrueckii* se pueden utilizar para mejorar la dominancia de esta levadura durante la fermentación. Aquí se analiza su utilidad para elaborar cava. La espuma de los vinos base de *T. delbrueckii* fue muy baja comparada con los de *Saccharomyces cerevisiae*. Se encontraron correlaciones positivas significativas de los parámetros de espuma con las cantidades de ésteres de etilo C4-C16 y proteínas, y negativas con algunos alcoholes antiespumantes. La calidad organoléptica de los vinos base *T. delbrueckii* se consideró inapropiada para elaborar cava. Mientras que *S. cerevisiae* (sola o mezclada con *T. delbrueckii*) completó la segunda fermentación para producir vinos espumosos secos con alta presión de CO_2, *T. delbrueckii* no completó esta fermentación, dejando los vinos dulces con baja presión de CO_2. La muerte debida a la presión de CO_2 fue mucho mayor en *T. delbrueckii* que en *S. cerevisiae*, lo que hizo irrelevante cualquier efecto asesino de *S. cerevisiae* sobre *T. delbrueckii*. No obstante, la calidad organoléptica de los cavas inoculados con mezclas de las dos especies de levaduras fue mejor que la de los vinos inoculados exclusivamente con *S. cerevisiae*, y no se observó deterioro en la calidad de la espuma.

En primer lugar, se elaboró vino base (variedad Macabeo, mosto <100 NTU) inoculando con levaduras killer y sensibles de *T. delbrueckii* o *S. cerevisiae*. La cinética de fermentación de las levaduras *Torulaspora* fue más lenta que la de *Saccharomyces*, aunque todas dominaron fácilmente la fermentación y dejaron los vinos secos. Los vinos de *Saccharomyces* tuvieron más proteínas y mejor espumabilidad (HM) y espuma estable (HS), y los de *Torulaspora* más polisacáridos y mejor tiempo de estabilidad de la espuma (TS). En general, considerando todos los vinos en conjunto, hubo correlación positiva significativa de HM y HS con las proteínas y 31 compuestos aromáticos, fundamentalmente ésteres etílicos C4-C16; y del TS con varios alcoholes. La correlación de HM y HS con los polisacáridos fue negativa, al igual que del TS con otros 35 compuestos, fundamentalmente alcoholes.

Los vinos base de *Saccharomyces* se utilizaron para elaborar cava. La calidad organoléptica de los vinos base de *Torulaspora* se consideró atípica para este propósito. Antes de la elaboración de espumosos en botella (alta presión), se utilizaron tubos de plástico estériles de 15 mL para analizar la capacidad fermentativa de *Torulaspora* en condiciones de baja presión (máximo 1,5 atm) [3]. Se utilizó una levadura *S. cerevisiae* killer Klus [2], y una *T. delbrueckii* sensible, procedente de una *Torulaspora* killer Kbarr-1 [1]. Se realizaron tres series de segundas fermentaciones: *S. cerevisiae* (Sc), *T. delbrueckii* (Td) y mezcla de ambas (Sc+Td, 1:10).

Las series Sc y Sc+Td fueron muy eficaces, alcanzando 6 o más atm de presión a los 60 días. Por el contrario, las levaduras de la serie Td mostraron poca viabilidad y no

completaron la segunda fermentación en estas condiciones. El porcentaje de muerte celular fue siempre mayor en Td. Sc desplazó totalmente a Td en la serie Sc+Td a los 60 días (no mostrado). Los espumosos de Sc y Sc+Td fueron vinos de buena calidad, tal como indicaron los parámetros físico-químicos y el análisis organoléptico. Los vinos Sc+Td fueron los más apreciados por su complejidad, mejor sensación en boca, aromas a fruta seca, y agradable carácter envejecido. Por el contrario, los cavas de Td presentaron niveles bajos de presión, alcohol y acidez total, y mayores de acidez volátil, azúcares reductores y pH; lo que explicaría su baja puntuación en la cata (Tabla 1).

Parámetros	Levaduras			p^a
	Sc	Td	Sc+Td	
Alcohol (%, v/v)	11.4±0.01a	10.6±0.15b	11.3±0.32a	0.050
pH	3.16±0.01a	3.57±0.04c	3.28±0.07b	0.010
Acidez total (g/L)	5.82±0.05a	5.15±0.05b	5.35±0.05b	0.010
Acidez volátil (g/L)	0.27±0.02a	0.47±0.01b	0.44±0.01b	0.010
Glucosa+fructosa (g/L)	0.06±0.0a	7.4±0.1b	0.07±0.01a	0.000
Densidad (g/L)	989±0.0a	998±0.0b	992±0.0a	0.007
Presión (atm)	6.1±0.05a	3.2±0.90b	6.05±0.05a	0.000
Preferencia (%)	65±0.00a	47±1.50b	78±2.50c	0.000

Tabla 1: Algunos parámetros relevantes y calidad organoléptica de los espumosos elaborados con levaduras *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii*, o mezcla de ambas. (a, b y c, indican diferentes grupos homogéneos con test Duncan, p≤0,05).

En general, los parámetros de espuma en los cavas fueron peores que en los vinos base. Los espumosos de *Saccharomyces* (Sc y Sc+Td) tuvieron el mejor HM, y los de *Torulaspora* (Td y Sc+Td) el mejor TS y mayor cantidad de polisacáridos totales y manano (Figura 1A y B). Aunque no hubo diferencias en la cantidad de proteínas de los tres espumosos, incrementó en éstos un 30% respecto el vino base (Figura 1B). Finalmente, hubo diferencias significativas en 15 de los 75 compuestos volátiles analizados: 7 compuestos más abundantes en Td, y 8 más abundantes en Sc y Sc+Td, principalmente ésteres etílicos responsables de aromas afrutados (Figura 1C), y con un valor relevante de actividad odorante (VAO).

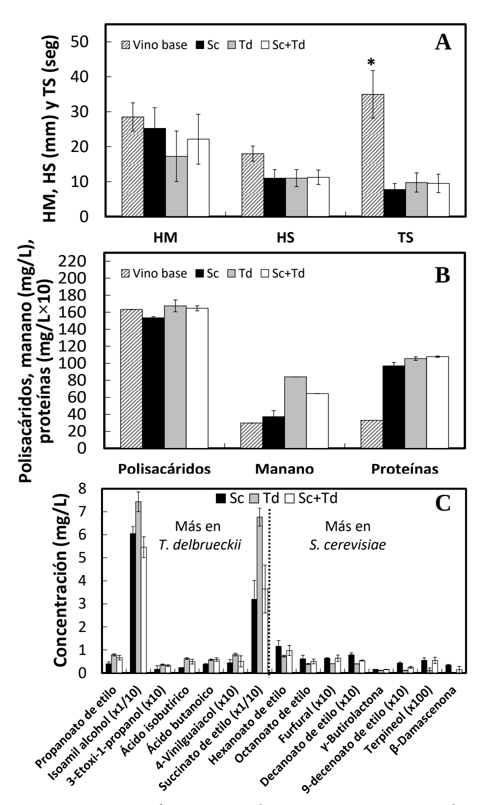


Figura 1: A, parámetros de espuma. HM, altura máxima; HS, altura de estabilidad; TS, tiempo de estabilidad. *Valor TS del vino base dividido por diez. **B**, polisacárido medio, manano y proteína. **C**, compuestos aromáticos para los que se encontraron diferencias significativas entre los vinos espumosos.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto GR18117 financiado por la Junta de Extremadura y Fondo Regional de Desarrollo Europeo. Proyecto AGL2017-87635-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (cofinanciado con fondos FEDER). Análisis de aromas realizado por el Servicio de Análisis Elemental y Molecular de la UEx (financiado por la UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER, and FSE).

REFERENCIAS

[1] Ramírez, M., Velázquez, R., Maqueda, M., López-Piñeiro, A., Ribas, J.C. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 983.

[2] Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, E., Ramírez, M. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1822–1832.

[3] Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M., Álvarez, M. L., Ramírez, M. *Food Microbiol.* **2016**, *59*, 150-160.

SELECCIÓN DE LEVADURAS AUTÓCTONAS EN LA VARIEDAD DE UVA ALBARIÑO DE LA D.O. RIAS BAIXAS

Batle L., Miró G., Puxeu M., Mislata A.M., Ferrer-Gallego R., Andorrà I.
Centre Tecnològic del Vi (VITEC). Ctra. Porrera, Km. 1. 43730 Falset (Tarragona)
imma.andorra@vitec.wine

La selección de levaduras autóctonas para la producción de vino se puede utilizar para potenciar las características enológicas diferenciales que determinan una región vitivinícola [1]. En este estudio, se aislaron, identificaron y caracterizaron levaduras procedentes de uva de la variedad Albariño de la D.O. Rias Baixas.

Para ello, se aislaron levaduras sobre uvas de diferentes parcelas y en diferentes puntos durante la fermentación alcohólica, en fermentaciones espontaneas. Posteriormente, se identificaron a nivel de especie mediante la técnica RFLP-ITS [2] y a nivel de cepa siguiendo la metodología de los elementos delta [3]. Finalmente, se realizaron fermentaciones con inoculaciones puras y mixtas de las diferentes levaduras identificadas. Se analizaron los parámetros químicos básicos (pH, ATT, ácido málico, ácido láctico, dióxido de azufre, glicerol y acidez volátil) y los compuestos fermentativos (esteres etílicos, alcoholes, acetatos y ácidos grasos) mediante GC/MS.

Directamente de las uvas de diferentes parcelas, se identificaron seis especies de levaduras, correspondientes a *Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum* y *Hanseniaspora guilliermondii*. La levadura predominante en todas las parcelas fue *Hanseniaspora* (principalmente *H. uvarum*). No se identificó *S. cerevisiae* en la uva proveniente de las diferentes parcelas.

En las microvinificaciones espontaneas, en una de ellas solo se aisló *S. cerevisiae* tanto al inicio, mitad y final de fermentación. En otra, se aisló aparte de *S. cerevisiae* dos especies más al inicio de fermentación (*Pichia membranaefaciens* y *Metschnikowia pulcherrima*). La tercera microvinificación fue la que presentó mayor diversidad de especies de levaduras, al inicio de fermentación se aislaron cinco especies diferentes (*Pichia membranaefaciens*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida zemplinina* y *Saccharomyces cerevisiae*). A mitad y a final de fermentación la única especie identificada en las tres microvinificaciones fue *S. cerevisiae*.

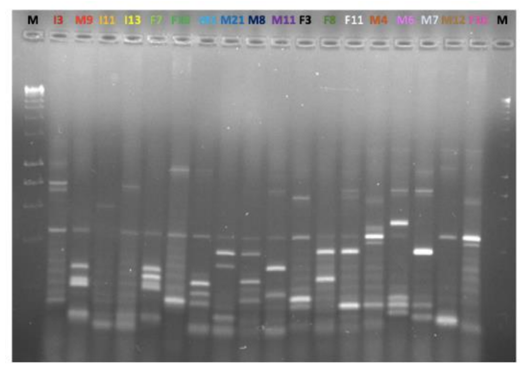


Figura 1. Perfil genético de las 18 cepas de *S. cerevisiae* mediante Elementos Delta (M: marcador molecular 1kb).

El aislamiento de levaduras autóctonas a partir de uva y de diferentes microvinificaciones espontanees ha permitido identificar hasta diez especies de levaduras. También se ha observado una gran diversidad intraespecífica dentro de la especie *S. cerevisiae*, ya que se han identificado dieciocho cepas diferentes. En la Figura 1 se muestran los perfiles de las cepas identificadas de *S. cerevisiae*.

En las fermentaciones con cultivos puros, todas las cepas de *S. cerevisiae* inoculadas presentaron características fermentativas óptimas para ser utilizadas como cultivos iniciadores, excepto M7 y M12. Estas dos cepas fueron muy lentas en el consumo de azúcares y la M7 también presentó una acidez volátil muy alta.

En el estudio del porcentaje de imposición durante la fermentación masiva donde se inocularon todas las cepas de *S. cerevisiae* se observó que las cepas con mayor porcentaje de imposición fueron la cepa F11 (23.73%), seguida de la M4 (18,64%) y la F8 (16,95%) (Figura 2).

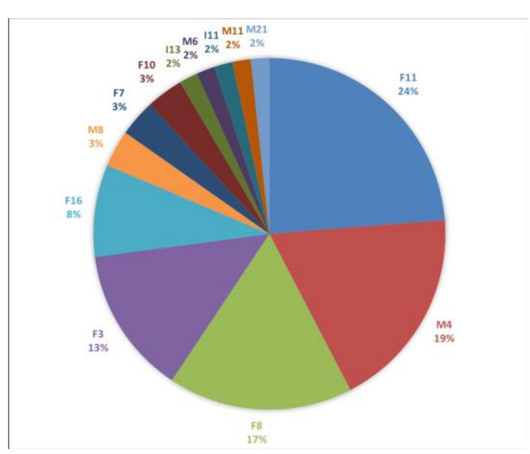


Figura 2. Porcentajes de imposición de las cepas de *S. cerevisiae* en la inoculación masiva.

Se utilizó la cepa F11 para realizar las fermentaciones con cultivos mixtos con las especies no-*Saccharomyces* identificadas inicialmente, debido principalmente a su elevada imposición y baja acidez volátil. Estas se realizaron inoculando en cada caso un 90% de la cepa no-*Saccharomyces* y un 10% de la cepa de *S. cerevisiae,* F11. Todas las fermentaciones alcohólicas con inoculaciones mixtas se realizaron correctamente, necesitando menos tiempo que la fermentación realizada con el cultivo puro de la F11. Las fermentaciones con las especies *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus flavescens* y *Cryptococcus magnus* fueron las más rápidas. Aunque se estudió una gran diversidad de especies no-*Saccharomyces*, no se obtuvieron grandes diferencias en referencia a los parámetros químicos básicos. Los parámetros que mostraron mayores diferencias fueron la acidez volátil, sulfitos totales y la concentración de glicerol. Se observaron mayores diferencias en los compuestos fermentativos, las inoculaciones mixtas con todas las levaduras no-*Saccharomcyes* presentaron mayores concentraciones de esteres etílicos, debido principalmente al octanoato de etilo y decanoato de etilo, y menores concentraciones de alcoholes debido principalmente al alcohol isoamilico comparadas con la fermentación pura con la cepa F11.

Por lo tanto, el uso de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* autóctonas podría mejorar la calidad y complejidad de los vinos, reflejando las características del terroir y de la variedad de uva.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por su apoyo financiero, Proyecto GLOBALVITI y a Bodegas Martín Còdax por su contribución en el proyecto.

REFERENCIAS

[1] B Padilla, D García-Fernández, B González, I Izidoro, B Esteve-Zarzoso, G Beltran, A Mas, *Front Microbiol*, **2016**, *7*, 930.

[2] B Esteve-Zarzoso, C Belloch, F Uruburu, A Querol A, *J Syst Bacteriol*, **1999**, *49*, 329–337.

[3] JL Legras, F Karst, *FEMS Microbiol Lett*, **2003**, *221*, 249–255.

LA DIVERSIDAD DE CEPAS DE *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS* AISLADAS EN CATALUÑA

Martínez-Safont M., Lleixà J., Mas A., Portillo M.C.
Universitat Rovira i Virgili/ Facultat d'Enologia/Departament de Bioquímica i Biotecnologia/ Biotecnologia Enològica. C/ Marcel·lí Domingo 1. 43007 Tarragona.
jessica.lleixa@urv.cat

La presencia de *Brettanomyces bruxellensis* en el vino continúa siendo una de las grandes amenazas para los enólogos de todo el mundo. Esta levadura provoca el deterioro del vino debido a su habilidad de producir compuestos fenólicos que afectan negativamente el perfil organoléptico del vino final. Además, este hecho se ve agravado por su capacidad de desarrollarse en las barricas durante el período de crianza del vino generando grandes pérdidas económicas para las bodegas.

¿Qué características fisiológicas presenta esta levadura para sobrevivir en las condiciones adversas que se dan durante la crianza? Por un lado, *B. bruxellensis* es capaz de desarrollarse en concentraciones elevadas de etanol y sulfuroso, en condiciones pobres de nutrientes y con baja disponibilidad de oxígeno. Además, esta levadura está presente en las instalaciones de la bodega formando biofilms que dificultan su eliminación [1]. Esto dificulta su control y eliminación en bodega.

Como ya se ha comentado, *B. bruxellensis* produce fenoles volátiles, principalmente 4-etilfenol y 4-etilguaiacol, a partir de los precursores, ácido cumárico y ácido ferúlico respectivamente, presentes en el vino. Estos compuestos fenólicos están asociados a aromas desagradables en el vino que recuerdan a cuadra o a caballo [2].

En la actualidad, existen varios estudios recientes sobre la diversidad genética de *B. bruxellensis* de diferentes regiones vitivinícolas del mundo y se ha conseguido relacionar diferentes genotipos de *B. bruxellensis* con una mayor o menor tolerancia a sulfuroso y con su potencial para producir fenoles volátiles [3]. Sin embargo, aún no se ha evaluado la diversidad de esta levadura en Cataluña.

En el presente trabajo se han muestreado vinos de crianza y reserva de diferentes bodegas pertenecientes a distintas denominaciones de origen de Cataluña (D.O. Penedés, D.O. Tarragona, D.O. Priorat y D.O. Montsant) con el objetivo de obtener aislados de *B. bruxellensis* de diferentes zonas vinícolas catalanas, clasificarlos genotípicamente así como analizar su tolerancia a sulfuroso y la capacidad de producción de fenoles volátiles. Para ello, las muestras de vino contenido en barricas de las distintas bodegas fueron tomadas en distintos tiempos de crianza. Se sembraron en un medio WLN con cicloheximida selectivo para aislar *B. bruxellensis*. A partir de los aislados obtenidos, se extrajo el DNA y se comprobó tanto por 5.8S-ITS-RFLP como por la secuenciación del dominio D1/D2 de la región del 26S rDNA que pertenecieran a la especie *B. bruxellensis.* Finalmente, un total de 65 aislados identificados como *B. bruxellensis* fueron tipificados genéticamente mediante una PCR-ISS multiplex utilizando los primers DbEI1, EI1 y LA2 y con la visualización de las bandas resultantes en un gel de agarosa al 2% [4]. Los perfiles electroforéticos fueron analizados mediante el programa GelJ agrupando los patrones de bandas según su similitud usando el coeficiente Dice y se construyó un dendograma con el método UPGMA. Los aislados se agrupaban dentro del mismo *cluster* si compartían más del 90% de similitud.

De cada uno de los grupos de genotipos identificados se seleccionaron dos aislados para el análisis de tolerancia a sulfuroso

usando placas de 96 pocillos con medio YNB a pH 3,5 que contenía diferentes concentraciones de SO_2 libre (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 y 60 mg/L) y en el que se inocularon los diferentes aislados por triplicado a una OD de 0,1 (10^6 cél/mL). Después de 7 días se midió la absorbancia a 600nm para determinar a qué concentración máxima de SO_2 eran capaces de crecer (OD≥0,4).

Los 65 aislados de *B. bruxellensis* identificados se clasificaron genotípicamente en 9 grupos (Figura 1). Se observó una segregación genética de la mayoría de aislados en base a la D.O. de origen. Por ejemplo, en el grupo I se agrupan aislados de Penedés mientras que en el II y VI aislados del Priorat, en el IV y V de Tarragona y, finalmente, en el III se agrupan las dos réplicas de extracción y amplificación de la cepa de colección "CECT 1009", demostrando así la efectividad y reproducibilidad de la técnica usada para la tipificación genética. Por último, en los grupos VII, VIII y IX se mezclan diferentes aislados de varias D.O.s pero suele predominar una de ellas.

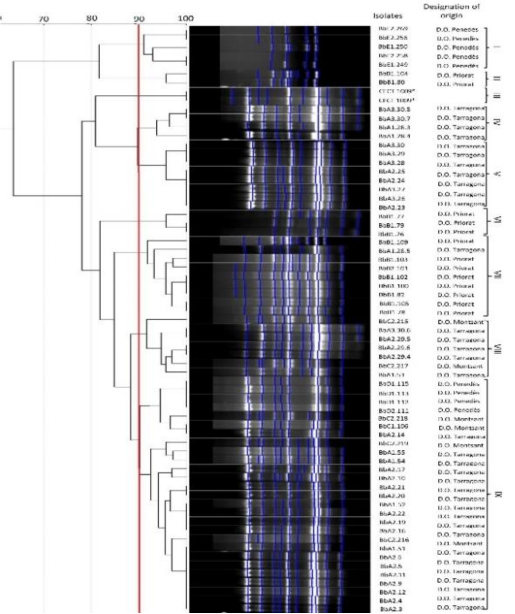


Figura 1: Dendograma construido a partir del análisis UPGMA comparando los perfiles obtenidos después de la PCR-ISS multiplex.

Dos aislados de cada grupo fueron analizados para la tolerancia a SO_2, tal como se ha descrito previamente. En la Figura 2 podemos observar el resultado obtenido a los 7 días para cada grupo.

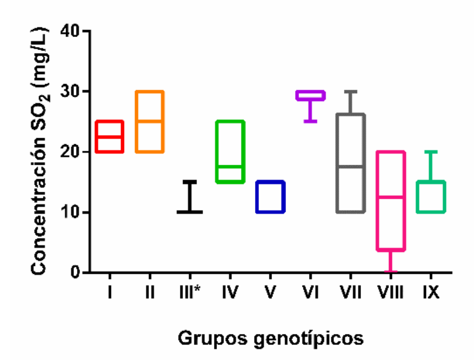


Figura 2: Concentraciones de SO_2 en las que los aislados de los diferentes grupos son capaces de crecer. El asterisco corresponde a la cepa de colección CECT 1009.

Los grupos I, II y VI son los que muestran una mayor tolerancia a concentraciones elevadas de SO_2 (todos los aislados crecen a ≥20 mg/L de SO_2) y corresponden a los aislados del Penedés y Priorat. Por otro lado, los grupos III (CECT1009), V y IX muestran una menor tolerancia a SO_2. También cabe destacar que el grupo VII y VIII son los que presentan una mayor variabilidad de resistencia al sulfuroso. Estos resultados preliminares sugieren una relación genotípica de los aislados con la tolerancia a SO_2.

Por último, el trabajo futuro incluirá el estudio de la capacidad de producción de fenoles volátiles y la resistencia a SO_2 de los aislados en vino sintético y aclararán si realmente existe esta relación genotipo dependiente.

AGRADECIMIENTOS

Esta comunicación ha sido posible con el apoyo de la Universitat Rovira i Virgili (URV) (2016PMFPIPF-8).

REFERENCIAS

[1] B. D. Smith, B. Divol, *Food Microbiol.*, **2016**, *59*, 161-175.

[2] C. Curtin, C. Varela, A. Borneman, *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2015**, *21*, 680-692.

[3] M. R. Di Toro, et al. *LWT--Food Sci. Technol.*, **2015**, *60*, 102-108.

[4] I. Vigentini, C. Picozzi, R. Foschino, *Ann. Microbiol.*, **2011**, *61*, 153-157.

IMPACTO DE PRIONES TIPO [*GAR*+] SOBRE LEVADURAS ENOLÓGICAS

Mencher A.[1], **Curiel J.A.**[1], **Morales P.**[1], **Tronchoni J.**[1], **Rodrigues A.J.**[1], **Patil K.**[2], **Jouhten P.** [2], **González R.** [1]

1 Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino. CSIC-Universidad de La Rioja-Gobierno de La Rioja. Logroño, Spain.

2 Structural and computational biology. EMBL. Heidelberg. Germany.

ana.mencher@icvv.es

[*GAR*+] es un elemento epigenético de tipo prion que alivia la represión por catabolito en *Saccharomyces cerevisiae*. La represión por catabolito de carbono es un fenómeno común en muchos microorganismos por el cual la transcripción de los genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas está reprimida en presencia de algunos azúcares, fundamentalmente la glucosa y la fructosa ya que éstos son metabolizados con mejor eficiencia.

Tras su descubrimiento, se propuso que este elemento podía tener relevancia tanto sobre la supervivencia de las levaduras enológicas y su eficiencia en la utilización de sustratos, como sobre el rendimiento alcohólico durante la fermentación. Sin embargo, otros resultados de los mismos grupos de investigación no parecen apoyar estas expectativas [1,2]. Asimismo, también se ha propuesto su implicación en paradas de fermentación.

En este trabajo, se han aislado cepas prionicas a partir de diversas cepas de levaduras enológicas y una de laboratorio (W303, EC1118, Fx10, T73, IFI87, UCD522, IFI473). Las cepas [*GAR*+] crecen en medio GGM, que contiene glicerol como fuente de carbono y glucosamina como análogo no utilizable de la glucosa (figura 1). En cambio, las cepas [*gar*-] no pueden crecer en este medio porque la represión inducida por la glucosamina impide el metabolismo del glicerol. En el estudio, se ha abordado el efecto de dichos elementos [*GAR*+] en estas levaduras enológicas desde diferentes perspectivas, como la represión por catabolito de carbono, factores que afectan la aparición y estabilidad del estado priónico y el impacto fisiológico en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas de fermentación en mosto de uva.



Figura 1. Aislamiento de variantes [*GAR*+] capaces de crecer en medio GGM (glicerol + GlcN) a partir de los siete fondos genéticos probados.

Nuestros resultados confirman el impacto de [*GAR*+], pero solo para ciertos fondos genéticos. Hemos observado frecuencias claramente diferentes de aparición del prion y estabilidad priónica en función del fondo genético, como se observa en la figura 2 y 3, respectivamente.

Cepa	Frecuencia de aislamiento (%)
W303	< 0.01
EC1118	0.5 - 1
FX10	0.1 - 0.5
T73	< 0.01
IFI87	0.1 - 0.5
UCD522	0.5 - 2
IFI473	0.1 - 1

Figura 2: Frecuencia de aparición del prion en las distintas cepas de levaduras.

Se ha encontrado que la penetrancia del fenotipo es baja y varía desde alrededor del 50% hasta el 1%, y que la desecación (curado del prion) reduce la penetrancia en todos los fondos genéticos. Por otra parte, la heredabilidad es alta y la desecación afecta de forma negativa a la herencia en la mayoría de las cepas, lo que sirve como confirmación de que no se trata de una mutación cromosómica.

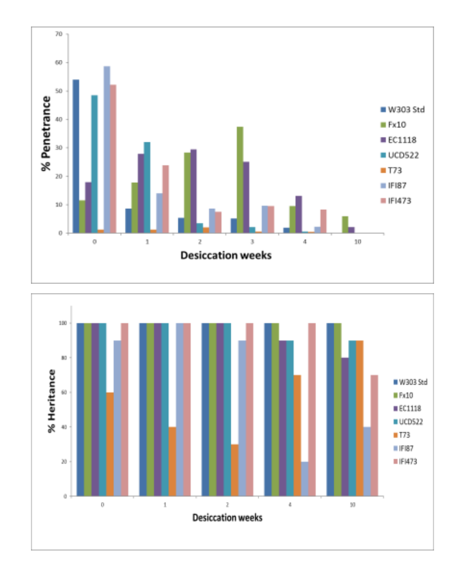


Figura 3: Penetrancia y herencia del prion en las distintas cepas de levaduras.

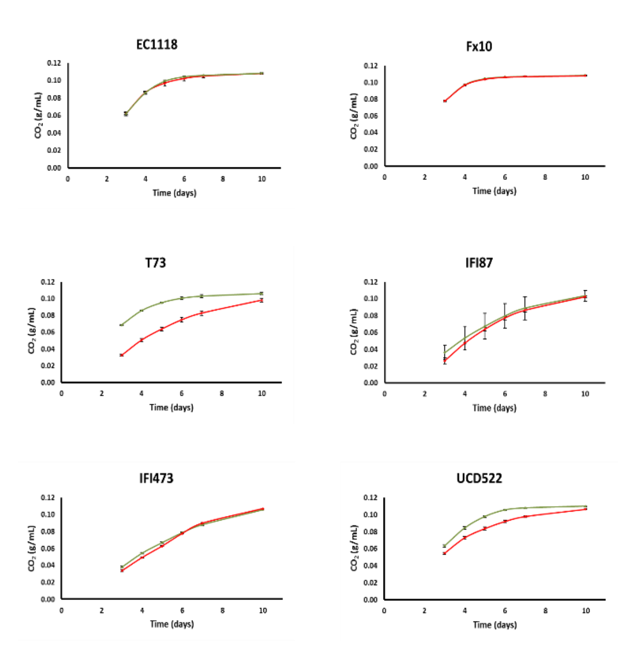


Figura 4: Perfil de fermentación mediante pérdida de CO_2 en diferentes fondos genéticos.

Con respecto a la fermentación de mosto natural, en algunas cepas el fenotipo de la cepa [*GAR*+] es indistinguible del de la original [*gar*-]. Sin embargo, para otros genotipos, las cepas [*GAR*+] muestran menor poder fermentativo en términos de azúcar residual, pérdida de CO_2 (figura 4) y, solo bajo ciertas condiciones, de producción de etanol y acético en comparación con levadura isogénica [*gar*-].

En conclusión, las diferencias de fondo genético afectan fuertemente al fenotipo [*GAR*+]. La heredabilidad es alta, sin embargo, la penetrancia de [*GAR*+] es baja o muy baja en todos los entornos genéticos. Las cepas [*GAR*+] durante la fermentación del vino no presentan ventajas (algunas se retrasan en la fermentación) y, generalmente, tampoco impacto relevante en los rendimientos de etanol, ya sea bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Además, algunas cepas [*GAR*+] incrementan la acidez volátil en condiciones aeróbicas, lo que constituye un carácter negativo en el contexto enológico. Sin embargo, y a diferencia de lo descrito en algunos trabajos [2], el prion no parece justificar la parada de fermentación ya que estas cepas prionicas son capaces de acabar la fermentación sin problemas como las isogénicas [*gar*-].

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2015-63629-R; PhD AM, AJR; PostDoc JAC). JT está financiado por la Fundación General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas a través del programa COMFUTURO.

REFERENCIAS

[1] D.F. Jarosz, J.C.S. Brown, G.A. Walker, et al., *Cell*, **2014**, *158*, 1083-1093.

[2] G.A. Walker, A. Hjelmeland, N.A. Bokulich, *Am J Enol Vitic*, **2016**, *67*, 296-307.

CARACTERIZACIÓN POR MALDI-TOF MS DE LEVADURAS AUTÓCTONAS PRESENTES EN LAS VARIEDADES MALLORQUINAS DE UVA CALLET, GIRÓ-ROS Y PREMSAL

Menéndez Ana[1], Gomila Rosa Maria[2], Oliver Andreu[3], Bennàsar Antoni[4], Lalucat Jorge[1], Gomila Margarita[1]

1 Universidad de las Islas Baleares/Edificio Guillem Colom Casasnovas/Departamento de Biología/Microbiología. Ctra. de Valldemossa, km 7.5, 07122 Palma, Islas Baleares, España.
2 Universidad de las Islas Baleares/Servicios Cientificotécnicos. Ctra. de Valldemossa, km 7.5, 07122 Palma, Islas Baleares, España.
3 Bodegas Can Majoral, Carreró des Campanar, 07210 Algaida, Illes Balears, España
4 Universidad de las Islas Baleares/Departamento de Biología/Fisiología Vegetal. Ctra. de Valldemossa, km 7.5, 07122 Palma, Islas Baleares, España.
marga.gomila@uib.es, ana.menendez@uib.es

Las levaduras, presentes de forma natural en la superficie de la uva, juegan un papel muy importante durante el proceso de transformación del mosto en vino, siendo la fermentación alcohólica el proceso principal en la elaboración del vino. Estos microorganismos, no sólo son responsables de metabolizar los azúcares, sino que además tienen una gran relevancia en la formación de metabolitos secundarios, responsables de otorgar diferentes propiedades organolépticas al vino. A veces, estos microorganismos se ven afectados por condiciones ambientales desfavorables, lo cual interrumpe el desarrollo normal del proceso y es necesaria la adición de levaduras seleccionadas que aseguren una buena fermentación, lo que constituye uno de los mayores avances en la industria vitivinícola. La utilización de levaduras autóctonas seleccionadas (en lugar de las industriales) para garantizar la tipicidad del vino de una zona y asegurar la calidad de las cosechas es cada vez más habitual. Durante la fase de fermentación espontánea, donde hay una carencia inicial *S. cerevisiae*, se observa una sucesión de especies pertenecientes a los géneros *Candida, Cryptococcus, Hanseniaspora (Kloeckera), Metschnikowia, Pichia* o *Rhodotorula*. *Hanseniaspora uvarum* y *Candida* spp. como las más abundantes.

En este contexto, el desarrollo de métodos rápidos de identificación de levaduras en los estudios enológicos es importante, ya que resultan útiles para la identificación de posibles inóculos o para conocer la diversidad asociada a diferentes variedades de mosto. Los métodos clásicos requieren múltiples pasos a través del estudio de la morfología y fisiología celular, seguido del uso de técnicas moleculares basadas en la secuenciación de diferentes regiones del DNA. Estas técnicas ofrecen una alta precisión, sin embargo, pueden no resultar prácticas debido al tiempo requerido y al coste económico. Es por ello que el método MALDI-TOF MS está ganando relevancia como herramienta de identificación mucho más rápida y económica, identificando microorganismos incluso a nivel de subespecie.
Actualmente se conocen unas 1500 especies de levaduras [1], aunque relativamente pocas se incluyen en las bases de datos comerciales (p. ej. MALDI *Biotyper mass spectral database - Bruker Daltonics, Germany*) y la mayoría de éstas corresponden a objetivos clínicos. Este estudio explora la utilidad de la técnica

MALDI-TOF MS para la diferenciación de las levaduras autóctonas presentes en las variedades de uva mallorquina Callet, Giró-ros y Premsal. Con el fin de confirmar la identidad y correcta afiliación filogenética de las cepas obtenidas, las identificaciones por MALDI-TOF MS se confirmaron con la secuenciación de la región espaciadora intergénica ITS1, así como el gen que codifica al RNAr 18S, en algunos casos. De esta manera, se ha creado una base de datos de perfiles proteicos, y se ha incrementado la colección propia de levaduras enológicas de la viña mallorquina.

A partir de muestras de mosto fresco se aislaron 178 cepas en medio agar Sabouraud y agar WL diferencial suplementados con cloranfenicol. Todas ellas se caracterizaron mediante MALDI-TOF MS, identificándose satisfactoriamente la mayoría de ellas (77 %) a nivel de género y especie. Se siguió el procedimiento de extracción proteica basado en el método del ácido fórmico, siguiendo el protocolo sugerido por Gutiérrez et al. [2]. Nuestros análisis poblaciones se corresponden bien con otros estudios [2,3] indicando que *Hanseniaspora* spp. y *Metschnikowia* spp. dominan las comunidades en mosto fresco, siendo *H. uvarum* la levadura que más abunda y *S. cerevisiae* la que menos. Además, se observa que las comunidades de levaduras son muy similares en las 3 variedades de uva analizadas (Figura 1). Cabe destacar la ausencia prácticamente de *S. cerevisiae* en las variedades de Callet y Premsal.

En un 5% de las cepas aisladas, con la misma morfología colonial, no se pudo hacer una buena extracción para el análisis por MALDI-TOF MS, lo que implica la necesidad de modificar para ellas el proceso de extracción proteica. En un 17% de las ocasiones donde sí obtuvimos un buen espectro, no fue posible la identificación mediante la base de datos Biotyper, confirmando la necesidad de crear o disponer de una base de datos completa.

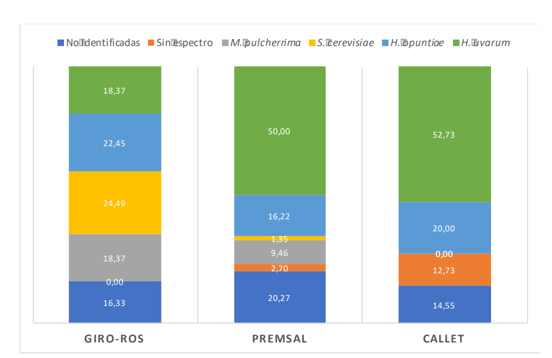


Figura 1: Diversidad poblacional de cada variedad de uva: Giró-ros, Premsal, Callet.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el proyecto "Métodos rápidos de identificación de levaduras enológicas de Mallorca, selección de cepas adecuadas para el proceso de vinificación (PROCOE/8/2017)" financiado por la Dirección General de Innovación e Investigación (Vicepresidencia y Consejería de Innovación, Investigación y Turismo, Gobierno Balear), así como por fondos FEDER.

REFERENCIAS

[1] Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (Eds.), "The Yeasts, a Taxonomic Study", fifth ed. Elsevier, Amsterdam. **2011**.

[2] Pinto C, Pinho D, Cardoso R, Custodio V, Fernandes J, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, Gomes AC. *Front. Microbiol.*, **2015**, *6*, 905.

[3] Gutiérrez C, Gómez-Flechoso MA, Belda I, Ruiz J, Kayali N, Polo L, Santos A. *Int. J. Food Microbiol.*, **2017**, *254,* 1–10.

EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS PARA LA REDUCCIÓN DE LAS POBLACIONES Y DE LOS AROMAS ASOCIADOS A *BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS*

Miró G., Puxeu M., Nart E., Ferrer-Gallego R., Andorrà I.
Centre Tecnològic del Vi (VITEC). Ctra. Porrera, Km. 1. 43730 Falset (Tarragona)
gemma.miro@vitec.wine

Brettanomyces bruxellensis es uno de los microorganismos contaminantes del vino de mayor importancia ya que genera una alta pérdida de su calidad sensorial, debido fundamentalmente a la aparición de aromas desagradables asociados a los compuestos 4-etilfenol y 4-etilguaiacol. Los aromas generados se asocian a olores que recuerdan al cuero, sudor de caballo, establo o barniz, por ello es de vital importancia un exhaustivo control del microorganismo para la elaboración de vinos de calidad. Controlar el desarrollo de *B. bruxellensis* es muy difícil ya que esta levadura está excepcionalmente bien adaptada a condiciones ambientales extremas (pH y alto grado alcohólico entre otras) como las que se pueden dar en el vino [1].

En este estudio, se ha evaluado la efectividad de diferentes tratamientos con el objetivo de reducir las poblaciones de *B. bruxellensis* y los aromas generados por este microorganismo (aroma a Brett) en vinos tintos. Para ello, por un lado se han empleado aditivos químicos (adición de quitosano y dimetil dicarbonato) y alternativas físicas (filtración) para reducir la población de *B. bruxellenis*. Por otro lado, para reducir los aromas mencionados se utilizaron cortezas de levaduras con enzimas *β*-glucanasas y carbón activo.

Los vinos tintos utilizados fueron elaborados a partir de uva de la variedad Tempranillo de la D.O. Ribera del Duero. Se utilizaron vinos control (sin adición de ningún producto), vinos contaminados con una población de 10^4 cél/ml de *B. bruxellensis* y vinos contaminados con 500 µg/l de 4-etilfenol.

a eficacia de los tratamientos fue evaluada mediante métodos dependientes de cultivo e indipendientes (qPCR) para la cuantificación del microorganismo y (GC-MS) para la cuantificación del aroma a Brett. Además, se realizó un análisis sensorial de todos los vinos.

En la Figura 1 se puede observar el efecto del quitosano sobre un vino contaminado con *B. bruxellensis*: la dosis mínima reduce más de dos órdenes de magnitud la concentración de éste y en la dosis máxima se detectan poblaciones relativamente bajas del microorganismo, inferiores a 10 cél/ml. Otros estudios también han demostrado una clara reducción de la población de *B. bruxellensis*, aunque no se eliminaba completamente el microorganismo después de los tratamientos con quitosano [2].

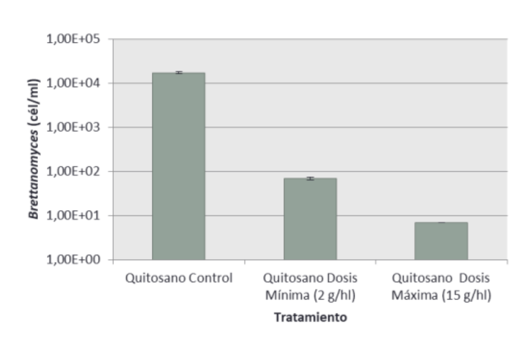


Figura 1: Concentración de *B. bruxellensis* en vinos tintos control y tratados con quitosano.

La adición de dimetil dicarbonato en los vinos tintos contaminados no resultó ser efectiva para reducir la población de *B. bruxellensis*, ni en la concentración mínima

(7,5g/hl) ni en la máxima legal permitida (20g/hl), manteniéndose alrededor de 10^4 cél/ml como el control.

La última alternativa estudiada en este estudio para reducir o eliminar la población de *B. bruxellensis* fue la filtración. Los vinos filtrados por 1,2 µm contenían mayores poblaciones del microorganismo que los vinos filtrados por 0,65 y 0,45 µm, respectivamente, disminuyéndose considerablemente la población del microorganismo hasta 100 cél/ml. Aunque estas filtraciones son más estrictas no se eliminó por completo el microorganismo, como ya habían descrito algunos autores [3].

Paralelamente al estudio de la reducción del microorganismo se estudiaron alternativas para disminuir los aromas generados por éste. Tanto el uso de *β*-glucanasas como de carbón activo redujeron la cantidad de fenoles volátiles del vino. No obstante, el carbón activo fue más efectivo, observándose en los resultados una reducción del 83% de la concentración de 4-etilfenol en vez del 20% con las *β*-glucanasas (Figura 2).

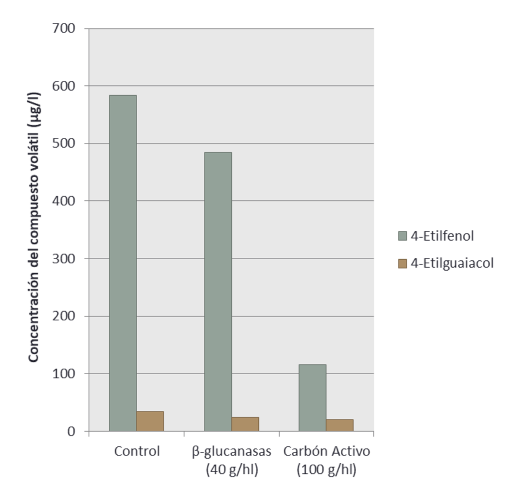


Figura 2: Concentración de fenoles volátiles en vinos tintos control y tratados con distintos clarificantes.

A parte de valorar la efectividad de los diferentes tratamientos para reducir tanto la población del microorganismo como del aroma, se valoraron sensorialmente los vinos para determinar a nivel aromático y gustativo la afectación de estos tratamientos.

Ambos aditivos químicos disminuían la astringencia de los vinos, además de producir una pérdida de fruta negra y roja, balsámico, especiado y acidez respecto los vinos control. Sensorialmente, los vinos filtrados no presentaron diferencias remarcables a nivel aromático y gustativo.

Los clarificantes estudiados modificaron el perfil organoléptico de los vinos. Los vinos control fueron mejor calificados, aun así, se valoraron mejor los vinos tratados con *β*-glucanasas por ser más equilibrados y con menor acidez en boca.

A pesar de la importante disminución de la población y del aroma de las técnicas alternativas estudiadas, se deben mejorar las estrategias de control para que las propiedades organolépticas del vino se vean menos afectadas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Economía, Industria y Competitividad por su apoyo financiero, Proyecto LIBRETT y a Bodegas Matarromera S.A. por su contribución en el proyecto.

REFERENCIAS

[1] M Louw, H Alexandre, B Divol, *Int. J. Food Microbiol.*, **2016**, *238*, 79-88.

[2] D Ferreira, D Moreira, EM Costa, S Silva, MM Pintado, JA Couto, *J. Chitin Chitosan Sci.*, **2013**, *1*, 1-6.

[3] A Costa, A Barata, M Malfeito-Ferreira, V Loureiro, *Food Microbiol.*, **2008**, *25(2)*, 422-7.

EFECTO DE LA AIREACIÓN SOBRE EL PERFIL AROMÁTICO DE DISTINTAS ESPECIES DE LEVADURAS VÍNICAS

Morales Pilar[1], Abashidze Ekaterine[2], González Ramón[1]
1 Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC-Universidad de La Rioja- Gobierno de La Rioja), Logroño, Spain
2 Institute of Horticulture, Viticulture and Oenology, Agrarian University of Georgia, Tbilisi, Georgia
pilar.morales@icvv.es

El incremento en el contenido en alcohol del vino se ha convertido en un problema mayor de la industria del vino. Como solución a este problema, nosotros propusimos el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en condiciones de aireación durante los primeros días del proceso, para permitir la respiración de los azúcares en exceso (1). Además de la capacidad para respirar los azúcares, otros parámetros importantes para la selección de las cepas son la cantidad de azúcares que son capaces de consumir durante la fase aerobia, y la cantidad de ácido acético que producen (2). Se comprobó la eficacia de la propuesta a escala de laboratorio, en una co-inoculación de *S. cerevisiae* con *M. pulcherrima* (3). Finalmente, en una elaboración en planta piloto, los vinos mostraron defectos aromáticos achacables a una combinación del efecto levadura x aireación (4). Por ese motivo, se incluyó la caracterización del perfil de compuestos volátiles producidos en condiciones de aireación entre los parámetros a tener en cuenta para la selección de las cepas. En este trabajo se estudia el efecto de la aireación sobre los compuestos volátiles producidos por diferentes especies de levaduras, para seleccionar cepas apropiadas para el proceso de fermentación aeróbica.

Materiales y Métodos

Se han utilizado 24 cepas de diferentes especies de levadura, representantes de las especies presentes en el mosto. Muchas de las cepas son aislados obtenidos en nuestro laboratorio.

Las levaduras se cultivaron en mosto natural estéril durante 5 días en condiciones aeróbicas (matraz con agitación) y anaeróbicas (tubo falcon con válvula). Al cabo de este tiempo, se analizaron los principales metabolitos por HPLC y los compuestos volátiles por GC/MS.

S. cerevisiae Sc50* (EC 1118, control)	H. uvarum Hu900 H. uvarum Hu982 H. uvarum Hu1037
S. cerevisiae Sc913	
S. cerevisiae Sc996	*L. thermotolerans* Lth845
S. cerevisiae Sc1018	*L. thermotolerans* Lth905 *L. thermotolerans* Lth970
S. uvarum Su929	
	M. pulcherrima Mp854
C. sake Csk262*	*M. pulcherrima* Mp898
C. sake Csk264*	*M. pulcherrima* Mp974
C. fructus Cft263*	*T. delbrueckii* Td846 *T. delbrueckii* Td858
C. zemplinina Czp1016	*T. delbrueckii* Td1008
C. zemplinina Czp1020	
C. zemplinina Czp1025	*St. bombicola* Stb268*

Tabla1. Cepas utilizadas en este trabajo. Las cepas señaladas con asterisco no son aislados de nuestra colección

Resultados

Todas las cepas mostraron un menor rendimiento en etanol en condiciones aeróbicas. Algunas cepas de *S. cerevisiae* mostraron bajos niveles de acético en condiciones aeróbicas.
Se han cuantificado 97 compuestos volátiles. El perfil de compuestos volátiles producidos en condiciones aeróbicas y anaeróbicas mostraba diferencias consistentes. Como se esperaba, la acetoína y el 2,3-butanodiol incrementaban en condiciones aeróbicas en la mayoría de las cepas. Pero algunas cepas

no seguían este patrón, lo que las convierte en interesantes para este proceso.
La producción de alcoholes superiores es mayor en condiciones aeróbicas, y la producción de algunos ésteres disminuye drásticamente con la aireación.
Algunos compuestos han mostrado ser dependientes de especie o cepa: la cepa Hu 1037 produce mucho más acetato de feniletilo que el resto; C. zemplinina produce compuestos derivados del benzeno en aerobiosis.

	% Sug. C		EtOHY(g/g)		AcY (mg/g)	
	AGT	STAT	AGT	STAT	AGT	STAT
Sc50	99.5	98.3	0.31	0.45	20.1	1.8
Sc913	99.5	92.6	0.32	0.46	21.5	2.2
Sc996	99.6	98.9	0.31	0.46	3.8	1.3
Sc1018	99.6	91.0	0.29	0.46	1.3	1.7
Su929	99.2	83.8	0.35	0.45	1.7	2.1
Cft263	79.4	12.3	0.31	0.42	10.6	0.9
CsK262	43.0	7.8	0.20	0.46	12.5	3.1
CsK264	68.0	9.5	0.27	0.45	16.2	0.4
CzP1016	76.5	59.1	0.35	0.44	0.5	5.2
CzP1020	79.9	57.8	0.33	0.45	0.9	6.0
CzP1025	72.9	60.6	0.34	0.45	1.7	5.2
Hu900	64.0	27.8	0.30	0.44	28.2	15.8
Hu982	61.6	26.9	0.32	0.46	24.7	12.9
Hu1037	99.6	64.9	0.32	0.46	16.8	8.4
Lth845	97.6	68.6	0.30	0.44	0.1	0.3
Lth905	91.2	70.2	0.30	0.45	0.1	0.5
Lth970	75.5	65.3	0.28	0.45	0.1	0.9
MP854	97.4	19.8	0.24	0.38	0.3	1.5
MP898	99.5	16.6	0.28	0.42	1.3	1.5
MP974	99.9	24.4	0.26	0.39	0.3	1.4
Td846	99.3	59.0	0.30	0.44	9.9	0.4
Td858	99.1	63.6	0.31	0.46	6.6	0.1
Td1008	99.3	69.3	0.32	0.46	9.5	0.2
Stb268	30.0	28.5	0.02	0.45	1.3	2.2

Tabla 2. Consumo de azucares y rendimiento de etanol y ácido acético por las cepas en condiciones aerobias y anaerobias.

Conclusiones
La aireación supone un cambio drástico en el perfil de compuestos volátiles producidos.
Una mezcla adecuada de cepas con un tiempo mínimo de aireación ayudaría a disminuir los niveles de etanol, con un cambio mínimo en el aroma.

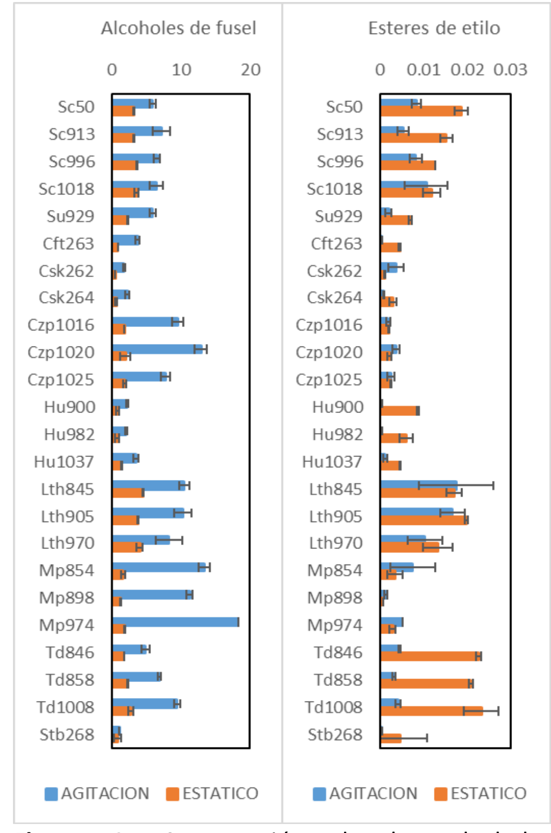


Figura 1. Comparación de los alcoholes superiores y los ésteres de etilo producidos por las cepas en condiciones aerobias y anaerobias.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo ha sido financiado por los proyectos MINECO AGL2015-63629-R (INTERWINE) y YeSVitE (7FP-IRSES-GA n° 612441)

REFERENCIAS
[1] R. Gonzalez, M. Quirós & P. Morales, *Trends Food Sci Technol*, **2013**, *29*, 55-61.
[2] M. Quirós, V. Rojas, R. Gonzalez, P.Morales, *Int J Food Microbiol*, **2014**, *181*, 85-91.
[3] P. Morales, V. Rojas, M. Quirós, R. Gonzalez, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2015**, *99*, 3993-4003.
[4] J. Tronchoni, J. A. Curiel, M. P. Sáenz-Navajas, P. Morales, A. de-la-Fuente-Blanco, P. Fernández-Zurbano, V. Ferreira, R. Gonzalez, *Food Microbiol*, **2018**, *70*, 214-2.

DETECCIÓN DE MELATONINA PRODUCIDA POR LEVADURAS VÍNICAS MEDIANTE UNA LÍNEA CELULAR HUMANA

Morcillo-Parra MA., Pastor R., Beltran G., Mas A., Torija MJ.

Universidad Rovira i Virgili/Departamento de Bioquímica y Biotecnología/Marcel·lí Domingo 1 43007

maangeles.morcillo@urv.cat

La melatonina (MEL) es una indolamina que podemos encontrar en animales, invertebrados, plantas, bacterias y hongos. Por ello, actualmente, MEL es considerada una molécula ubicua [1]. En los últimos años, se ha detectado esta molécula en pequeñas concentraciones (ng/ml) en algunos productos fermentados como vino o cerveza; siendo la levadura la responsable de la presencia de ésta durante la fermentación alcohólica [2]. En humanos, las funciones de MEL se han relacionado con la regulación del ritmo circadiano, así como con funciones reproductivas y antioxidantes. Además, recientemente, se ha descrito en levaduras su función como antioxidante [3]. La MEL puede ser detectada por diferentes técnicas: cromatografía líquida (HPLC) con detector de fluorescencia y acoplado a espectrometría de masas, cromatografía de gases con espectrometría de masas, cromatografía en capa fina con detección densimétrica, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación. Sin embargo, los métodos cromatográficos son los más utilizados en la detección en muestras procedentes de la fermentación alcohólica.

El objetivo de este estudio es proponer un nuevo método de detección de MEL, basado en una línea celular ósea que presenta uno de los receptores de MEL en humanos y compararlo con el sistema actualmente más utilizado para la detección de esta molécula, HPLC-MS/MS.
La línea celular ósea (TANGO) procedente de osteosarcoma epitelial contiene el receptor humano MTNR1b de MEL que controla la expresión del gen β-lactamasa. La detección se realiza mediante un sistema FRET (Transferencia de energía de resonancia de Förster). Las células TANGO se mantuvieron en medio McCoy's 5A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se cultivaron a 37ºC con una atmosfera de 5% de CO_2 en medio McCoy's suplementado con antibióticos. Para los análisis, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) y se crecieron en placas multipocillo en presencia de medio de ensayo suplementado con suero fetal bovino (FBS), aminoácidos, HEPES y antibióticos.

Diferentes muestras con concentraciones conocidas de MEL se extrajeron con cloroformo. Las muestras se diluyeron (1:1, v:v) con agua milliQ y se añadieron a un vial que contenía 10 volúmenes de cloroformo. Las muestras se agitaron a temperatura ambiente durante 1 h a 1200 rpm. La fase orgánica se evaporó con

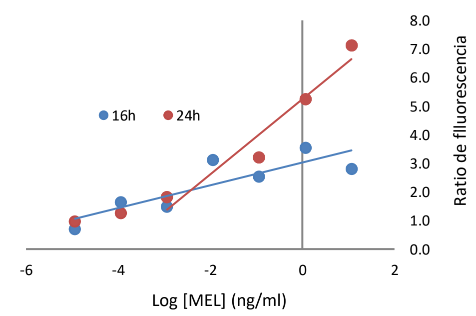


Figura 1: Ratio de fluorescencia en dos tiempos de estimulación (16 y 24 h) de la línea celular con MEL

nitrógeno gas y la muestra se resuspendió en medio de ensayo para el análisis con la línea celular y en una mezcla de agua:metanol (60:40, v:v) para el análisis mediante cromatografía. La detección en

HPLC-MS/MS se llevó a cabo mediante el equipo Agilent serie 1100 con una columna Zorbax Sb-18 150x0.5 mm 5 µM mediante un gradiente de agua y metanol en presencia de 0.1% (v/v) de ácido fórmico. La detección en la línea celular se llevó a cabo mediante LiveBLAzer FRET-B/G Loading Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). La intensidad de fluorescencia se analizó usando el lector de placas POLARstar Omega (BMG LABTECH, Alemania).

Para la optimización del método se estudiaron diferentes parámetros que afectan al crecimiento y detección mediante las células TANGO así como el efecto de la matriz en la que se encuentra la MEL. Para ello, se probaron diferentes concentraciones celulares (desde 1250 cél/pocillo hasta 50.000 cél/pocillo), la presencia o ausencia de FBS en el medio de

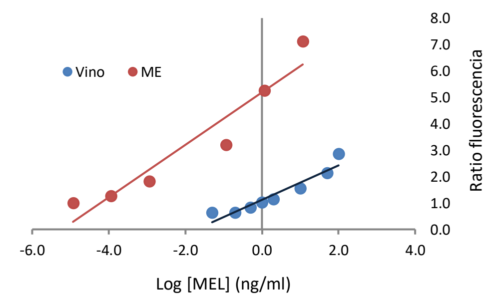


Figura 2: Comparación de la detección de MEL en muestras de vino y medio de ensayo (ME) mediante la línea celular

ensayo, la adhesión o no a la placa de las células antes de la estimulación, así como el tiempo de estimulación en presencia de MEL. Los mejores resultados se obtuvieron con 20.000 cél/pocillo, presencia de FBS, no adhesión previa de las células y 24h de estimulación con la muestra. En la Figura 1 se muestra el efecto de dos tiempos de estimulación de las células TANGO con MEL (16 y 24 h). Como puede observarse, el aumento del tiempo de contacto con MEL implica una mejora de la detección.

Posteriormente, se evalúo el efecto matriz, para lo que se prepararon soluciones de concentraciones conocidas de MEL en diferentes matrices, y se estudió la respuesta por ambos métodos de análisis. Las matrices estudiadas fueron: agua milliQ, PBS, mosto sintético, vino y medio de ensayo. El mejor medio para la detección de MEL con la línea celular fue el medio de ensayo.

La presencia de medios más complejos como el vino o el mosto resultó en una menor detección, reflejada en un ratio de fluorescencia menor (Figura 2). Sin embargo, cuando se comparó la detección de MEL en muestras de vino por ambos sistemas de análisis (Figura 3), observamos que la línea celular nos permite obtener una mayor sensibilidad para detectar MEL a niveles menores así como en un rango más amplio.

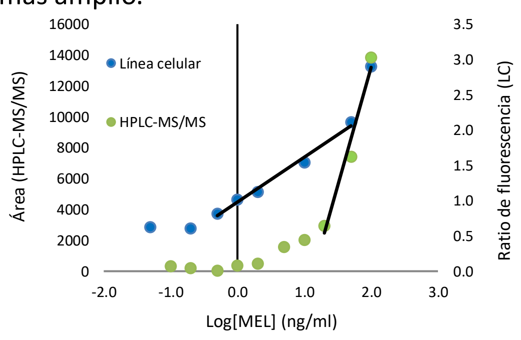


Figura 3: Comparación de la detección de MEL en vino entre HPLC-MS/MS y línea celular (LC)

Este nuevo método es más sensible para la detección de MEL que el HPLC-MS/MS, lo que es un avance para la detección de MEL en muestras donde su concentración se encuentra en niveles de ng-pg/mL como es el caso del vino.

AGRADECIMIENTOS

Esta comunicación ha sido posible con el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-77505-C3-3-R y BES-2014-070542)

REFERENCIAS

[1] DX Tan, LC Manchester, E Esteban-Zubero, Z Zhou *MOLEFW* **2015**, *20*, 18886-18906.

[2] MI Rodríguez-Naranjo, MJ Torija, A Mas, E Cantos-Villar, MC García-Parrilla *JPRSE9* **2012**, *53*, 219-224.

[3] J Vázquez, B González, V Sempere, A Mas, MJ Torija, G Beltran *Front.Microbiol* **2017**, *8*, 1066.

MELATONIN BIOSYNTHESIS IN *Saccharomyces Cerevisiae*

Muñiz-Calvo Sara, Bisquert Ricardo, Guillamón José Manuel
Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC), Biotechnology Department.
r.bisquert@iata.csic.es

Melatonin has multiple effects in different organisms such regulation of circadian rhythms and seasonal reproduction, immune system modulator, inhibitor of tumor growth and protection against UV light among others [1]–[5]. Antioxidant action of melatonin is well established, it can act as a free-radical scavenger, regulating antioxidant enzymes or contributing to homeostasis of mitochondria [6]–[9]. In wine, melatonin is produced by yeast during alcoholic fermentation and it depends on the growth phase of the yeasts and the concentration of tryptophan, reducing sugars and the growth medium [10]–[13]. It has been recently demonstrated that in yeast *Saccharomyces cerevisiae* melatonin exerts as an antioxidant and UV protector [14], [15]. It is hypothesized that melatonin can act as a growth signal molecule but the role of melatonin production is still unclear.

The classical melatonin synthesis pathway in mammals consists of the hydroxylation of L-tryptophan to form 5-hydroxytryptophan. Then 5-hydroxytryptophan is decarboxylated to 5-hydroxytryptamine and converted to *N*-acetyl-5-hydroxytryptamine by N-acetylation. Finally, the O-methylation of this product leads to the formation of melatonin. The enzymes responsible for these reactions are the following: L-tryptophan hydroxylase, dopa decarboxylase (5-hydroxy-L-tryptophan decarboxylase), arylalkylamine-*N*-acetyltransferase (serotonin acetyltransferase) and acetylserotonin *O*-methyltransferase.

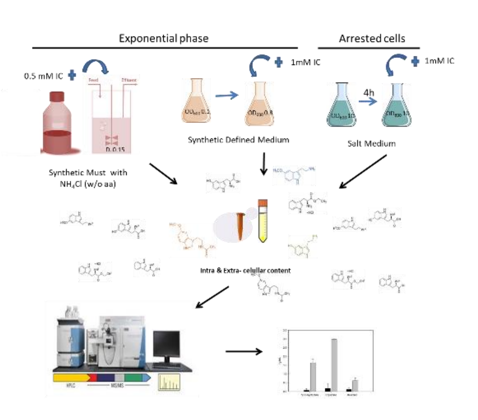


Figure 1: Outline of the strategies followed for bioconversion assays with three different growth systems.

Melatonin's biosynthetic pathway in yeast is adressed in Sprenger's work, in which high amounts of melatonin are produced after incubating yeast cells in a starvation salt medium for 4 hours and providing them with precursor's pulses of tryptophan, serotonin, N-acetylserotonin and 5-methoxytryptamine. Many research studies on melatonin biosynthesis in yeast have been conducted after Sprenger's, contributing to a better understanding of melatonin occurrence due to yeast metabolic activity. Nevertheless, melatonin biosynthetic pathway is still unknown. In order to obtain better understanding on melatonin metabolism we extended and deepened in Sprenger's work by analysing a wider range of metabolites, from three different growth systems. We performed bioconversion assays of all the metabolites involved in melatonin anabolism, including tryptamine and 5-OH-tryptophan. All the bioconversion assays have been conducted in three different cell growth systems and analysed by HPLC-MS/MS, one of them being Sprenger's "starvation" approach, that produces an initial depletion of intracellular metabolites. We have also

determined indoles production in exponentially growing cells in minimal synthetic defined medium, but also using a microfermentor we analysed exponentially growing cells in a synthetic must, in which the nitrogen source was ammonium chloride. We analysed bioconverted products at extracellular and intracellular level (Fig 1).

Through this approach we have verified melatonin synthesis is not a major route in yeast, and in the first biosynthetic reactions it is similar to that biosynthetic pathway occurring in plants in which bioconverting tryptophan to serotonin goes through a decarboxylation step, followed with a hydroxylation step. In yeast this occurs in a much more noticeable way than the reverse process, which corresponds to what happens in mammals. We also verified 5-methoxytryptamine is strongly bioconverted to melatonin corresponding with Sprenger's results, although we didn't find consistent production of 5-methoxytryptamine from serotonin.

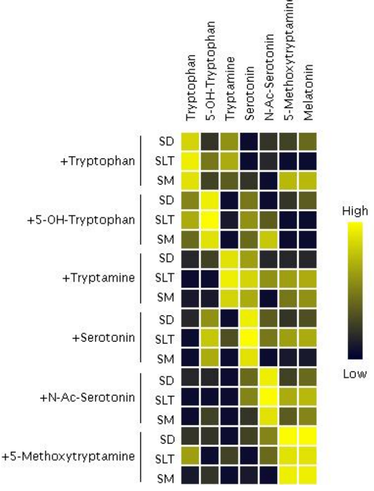


Figure 2: Increases in the different indolic compounds after each pulse in the three different growth systems (SD: synthetic defined, SLT: salt medium and SM: synthetic must).

Figure 2 shows a summarized compilation of the bioconversion of every metabolite studied in each growth system.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Spanish Government and Generalitat Valenciana for financial support through MINECO and FEDER (AGL2016-77505-C3-1-R and PCIN-2015-143 grants) and from Generalitat Valenciana through PROMETEOII/2014/042 grant.

REFERENCES

[1] I. Chowdhury, A. Sengupta, and S. K. Maitra*Indian J. Biochem. Biophys.*, **2008**, *45*, 289–304.
[2] K. Kleszczyñski, L. H. Hardkop, and T. W. Fischer, *Dermatoendocrinol*., **2011**, *3*, 27–31.
[3] T. W. Fischer, G. Scholz, B. Knöll, U. C. Hipler, and P. Eisner, *J. Pineal Res.*, **2004**, *37*, 107–112.
[4] L. Reiter, RJ.; Tan, DX; Rosales-Corral, S; Manchester, *Mini-Reviews Med. Chem.*, **2013**, *13*, 373–384.
[5] D. X. Tan et al., Biol. Rev., **2010**, *85*, 607–623.
[6] M. Martín et al., *J. Pineal Res*., **2000**, *28*, 242–8.
[7] S. A. Ganie et al., *Rejuvenation Res*., **2016**, *19*, 21–40.
[8] C. Rodriguez et al., *J. Pineal Res*., **2004**, *36*, 1–9, 2004.
[9] R. Hardeland., *Endocrine*, **2005**, *27*, 119–130.
[10] M. I. Rodriguez-naranjo, A. Gil-izquierdo, A. M. Troncoso, E. Cantos-villar, and M. C. Garcia-parrilla, *Food Chem*., **2011**, *126*, 1608–1613.
[11] M. C. Fernández-Cruz, Edwin; Álvarez-Fernández, M. Antonia; Valero, E.; Troncoso, A.M; García-Parrilla, *Food Chem*., **2015**, *I*, 341–345.
[12] M. I. Rodriguez-Naranjo, M. J. Torija, A. Mas, E. Cantos-Villar, and M. D. C. Garcia-Parrilla, *J. Pineal Res*., **2012**, *53*, 219–224.
[13] J. F. Meng, T. C. Shi, S. Song, Z. W. Zhang, and Y. L. Fang, *Food Chem*., **2017**, *231*, 185–191.
[14] J. Vazquez, B. Gonzalez, V. Sempere, A. Mas, M. J. Torija, and G. Beltran, *Front. Microbiol*., **2017**, *8*, 1–14.
[15] R. Bisquert, S. Muñiz-Calvo, and J. M. Guillamón, *Front. Microbiol*., **2018**, *9*, 1–11.

CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LEVADURAS NO-*Saccharomyces* DE INTERÉS ENOLÓGICO

Roca-Mesa H[1], Monath M[1], Ribes A[1], Navascués E[2], Mas A[1], Torija MJ[1], Beltran G[1]
1 Universitat Rovira i Virgili, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Grup de Biotecnologia Enològica, Facultat d'Enologia, c/ M. Domingo, 1. 43007 Tarragona, Catalonia, Spain
2 Agrovın S.A., Polígono Industrial Los Alces s/n, Alcázar de San Juan, Ciudad Real, Spain
elena.roca@estudiants.urv.cat

Introducción

La elaboración del vino es un proceso muy estudiado. La levadura por excelencia encargada de llevar a cabo la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae*. Hasta hace poco se pensaba que las especies no-*Saccharomyces* deterioraban el vino, por lo que no interesaba su presencia[1]. Actualmente está aumentando el interés hacia ellas, ya que se ha visto que contribuyen positivamente en la calidad del vino final[2].

En este estudio se analiza la capacidad fermentativa de diferentes especies de levaduras vínicas no-*Saccharomyces,* para su posible uso en inoculaciones mixtas.

Materiales y Métodos

Las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizaron como control fueron Diana (Sc1) y Revelación (Sc2) (Agrovin S.A.). Las cepas no-*Saccharomyces* fueron: NS-TD (Td1) y NS-P-169 (Td2) de *Torulaspora delbruecki*, NS-G-13 (Lt1) y NS-G-32 (Lt2) de *Lachancea thermotolerans* y NS-E-34 (Mp1) y NS-O-34 (Mp2) de *Metschnikowia pulcherrima*. Las levaduras estudiadas fueron cedidas por Agrovin S.A.

Los pre-cultivos se llevaron a cabo en medio YPD (2% glucosa, 2% Bactopeptona, 1% extracto de levadura; Cultimed, Barcelona, España) a 28ºC y 120 rpm durante 24h.
Se realizaron fermentaciones individuales por triplicado en 220 ml de mosto sintético (pH 3.3), descrito por Beltran et al.[3]. Las temperaturas de fermentación fueron 16 y 22ºC. Se siguió la cinética de fermentación midiendo la densidad del medio mediante densímetro electrónico (Densito 30PX Portable Density Meter (Mettler Toledo, España)) y el crecimiento de las levaduras mediante la densidad óptica (600nm) y la siembra en medio YPDA (YPD con 2% de agar). Además, se analizó el consumo de nitrógeno por HPLC, siguiendo el método descrito por Beltran et al.[3]. A final de fermentación se analizó la concentración de azúcares, ácido acético y glicerol mediante kits enzimáticos, con el Multianalizer Miura One (TDI, Barcelona, España) y el grado alcohólico por ebullometría (GAB System, Barcelona, España).

Resultados y Discusión

El efecto de la temperatura sobre la cinética de fermentación fue más pronunciado en las cepas de *S. cerevisiae* que en las no-*Saccharomyces*, en las que la diferencia cinética entre 16 y 22ºC fue menor. *T. delbruecki* fue la especie no-*Saccharomyces* más afectada por la temperatura, y *M. pulcherrima* la menos, aunque esta última no acabó la fermentación. Las cepas de *M. pulcherrima* mostraron una cinética de fermentación muy lenta a ambas temperaturas, dejando azúcar y nitrógeno por consumir, y llegando a poblaciones celulares menores. Por otro lado, tanto las cepas de *T. delbrueckii* como de *L. thermotolerans* fueron capaces de acabar la fermentación,

aunque necesitaron más tiempo que las cepas de *S. cerevisiae*, dejando solo algunos azúcares residuales a 16ºC en algún caso. Estos resultados muestran la buena capacidad fermentativa de estas dos especies no-*Saccharomyces*, principalmente a baja temperatura.

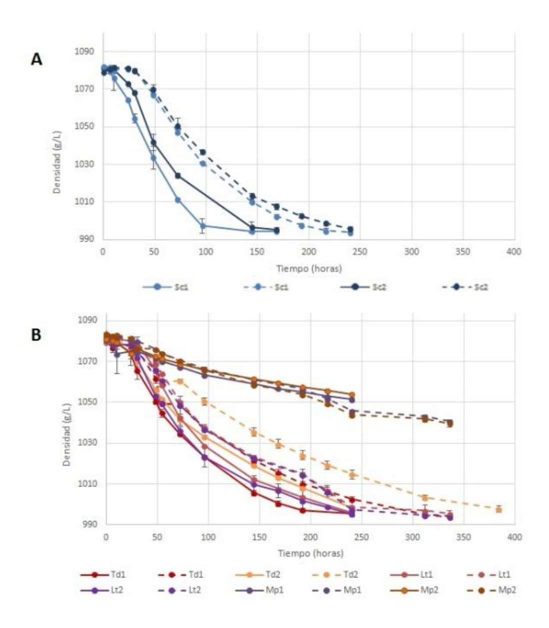


Figura 1: Cinéticas de fermentación donde las líneas continuas corresponden a 22ºC y las discontinuas a 16ºC. A: Cepas *S. cerevisiae Sc1* y Sc2. B: de las especies no-*Saccharomyces* Td1, Td2, Lt1, Lt2, Mp1 y Mp2.

El crecimiento de *S. cerevisiae* fue también el más afectado por la temperatura, disminuyendo el tiempo de generación a 16ºC. Este efecto apenas se observó con las levaduras no-*Saccharomyces*, mostrando una mejor la tolerancia de estas levaduras a crecer a bajas temperaturas.
Respecto a compuestos de interés al final de la fermentación cabe destacar que *T. delbrueckii* produce cantidades significativamente menores de ácido acético que *S. cerevisiae,* debido a su capacidad de fermentar azúcares lentamente[4].

El consumo de nitrógeno asimilable (YAN) durante la fermentación fue mayor y más rápido en las fermentaciones realizadas a 22ºC, principalmente para las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbruekii*. Comparando entre especies, los perfiles de consumo a 22ºC serían: *S. cerevisiae* la más rápida, seguida de *T. delbruecki* y *L. thermotolerans*, que tendrían un perfil de consumo intermedio, y por último las cepas de *M. pulcherrima*, con un consumo más lento y sin acabar todo el nitrógeno disponible. Esto concuerda con los estudios de *Gobert et al*[5], donde *M. pulcherrima* siguió un comportamiento similar. A 16ºC el consumo de nitrógeno de las cepas de *Saccharomyces* no se diferenció del de *T. delbruecki* y *L. thermotolerans*. Además, la baja temperatura tuvo un efecto mayor en el consumo de amonio, el cual se ve ralentizado, y en algún caso disminuido.

Por lo tanto, algunas de las cepas no-*Saccharomyces* de *T. delbrueckii* o *L. thermotolerans* analizadas en este estudio muestran un perfil fermentativo óptimo para ser utilizadas como iniciadores de la fermentación alcohólica, especialmente en inoculación secuencial con *S. cerevisiae.*

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo forma parte del Proyecto NUTRIAROMA (IDI-20160102), financiado por Agrovin S.A. y CDTI (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad).

REFERENCIAS
[1] S. Simonin, H. Alexandre, M. Nikolantonaki, C. Coelho, and R. Tourdot-Maréchal, *Food Res. Int.*, **2018**, *107*, 451–461.
[2] P. Brou, P. Taillandier, S. Beaufort, and C. Brandam, *Eur. Food Res. Technol.*, **2018**, 1–12.
[3] G. Beltran, M. Novo, N. Roz, A. Mas, and J. Guillamon, *FEMS Yeast Res.*, **2004**, *4*, no. 6, 625–632.
[4] M. Bely, P. Stoeckle, I. Masnruf-Pomarède and D. Dubourdieu, *Int. J. Food Microbiol.*, **2008**, *122*, 312–320.
[5] A. Gobert *et al.*, *Front. Microbiol.*, **2017**, *8*, 1–13.

FERMENTATION BEHAVIOUR AND NITROGEN REQUIREMENTS OF *S. cerevisiae* X *S. eubayanus* AND *S. cerevisiae* X *S. uvarum* HYBRID STRAINS

Su Y.[1], Gamero A.[2], López C.[2], Querol A. [1], Guillamón J. M.[2]

1 Systems Biology of Yeast with Biotechnological Interest (SBYBI), Biotechnology Department, Institute of Agrochemistry and Food Techology (IATA), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Valencia, Spain

2 Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina-Universidad Nacional del Comahue), Neuquén, Argentina

ying.su@iata.csic.es

Nitrogen is one of the most important nutrients for yeast and it has a significant impact on wine fermentation. However, along with the global warming, sugar concentration is increasing and assimilable nitrogen concentration is decreasing in the grape must in many wine regions. A enological practice to solve this problem is supplying nitrogen rich products into grape must to make sure the completion of the fermentation. However, this process is difficult to control. Moreover, excess nitrogen will lead to off-flavours in the final wine, and also it boosts the growth of other microorganisms like acetic acid bacteria. Another challenge facing by wine industry nowadays is that the main consumer preferences are for dry and aromatic wine. In order to preserve more aromas inside wine, more and more winemakers try to conduct fermentations at a lower temperature [1]. *S. cerevisiae*, which is the most dominant yeast species used for wine fermentation, is not very well adapted to low temperature fermentation. Therefore, the cryotolerant species *S. eubayanus* and *S. uvarum* are of great interest for us to explore their potential to be used in wine industry. In our previous study, we have analysed the growth and fermentative capacity of some cryotolerant strains at different nitrogen concentrations. The result showed that cryotolerant strains, especially strains of *S. eubayanus*, requires less nitrogen when conducting fermentations at lower temperatures. In order to combine the beneficial characters of both *S. cerevisiae* and cryotolerant species, in this study, hybrids *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* and *S. cerevisiae* x *S. uvarum* were constructed and the fermentative capacities were determined under different temperature and fermentation conditions.

The hybrids were constructed by spore to spore mating. They were then confirmed by restriction patterns of KEL2 by MSP1 gene [2] and RAPD analysis. Fermentations were carried out in synthetic must at 4 different conditions including the combinations of high (28°C) and low (12°C) temperatures and different nitrogen abundances (60 and 300mg/L YAN). Fermentations were carried out with mono-cultures of the parental strains (*S. cerevisiae* T73, *S. eubayanus* NPCC 1285, *S. uvarum* NPCC 1317), the hybrid strains (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*, *S. cerevisiae* x *S. uvarum*) and mix-cultures (*S. cerevisiae* + *S. eubayanus*, *S. cerevisiae* + *S. uvarum*). Fermentation kinetics were monitored by density of synthetic must. The time needed to consume 100% of sugar (T100) were calculated. Volatile compounds were

determined by gas chromatograph with a flame ionization detector.

The results of fermentation kinetic show that (figure 1) at 12°C and 60 mg/L YAN, none of the strains were able to finish the fermentation, since it was a very harsh condition. However, depending on our estimated data for T100, two hybrids strains *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* and *S. cerevisiae* x *S. uvarum* are the first ones to finish the fermentation. At 12°C and with 300mg/L YAN, all the fermentations were completed. Among them, hybrid strains were also the fastest sugar consumer. At higher temperature, all the fermentations were successfully completed. As low temperature fermentation, hybrid strains were the first ones to finish the fermentation, especially with low nitrogen concentration of 60 mg/L YAN. This indicates that the hybrid strains have good fermentative activities in a wide range of conditions. They can be used for harsh conditions as low temperature or low nitrogen fermentations.

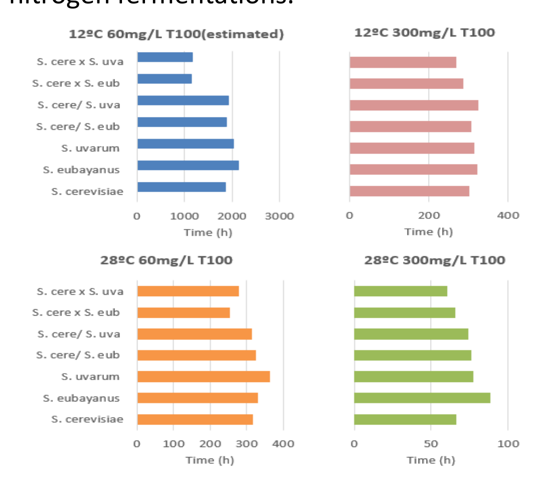


Figure 1: T100 of fermentations carried out under different conditions

In terms of aroma production (figure 2), in cases of completed fermentation, hybrid strains produce higher amount of higher alcohol and esters than parental strains with 12°C, 300 mg/L YAN and 28°C, 60 mg/L YAN. With 28°C, 300 mg/L YAN which is the optimal condition for *S. cerevisiae*, hybrid strains produce intermediate amount of volatile compounds between parental strains. Surprisingly, more production of higher alcohol and esters has been observed with 28 °C, 60mg/L YAN fermentation.

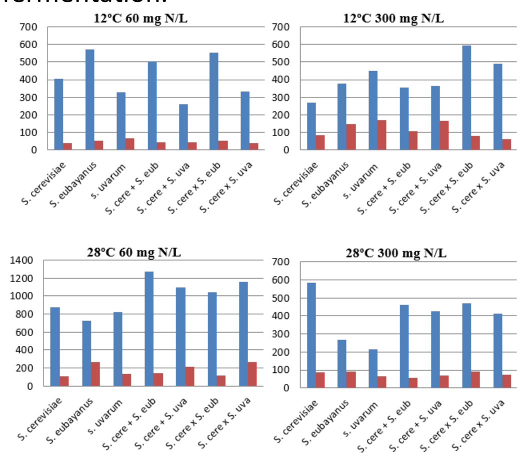


Figure 2: Aroma analysis at the end of the fermentation. Red bars represent esters and blue bars are higher alcohols.

In summary, there is a high potential for using the hybrid strains for wine making at low nitrogen or low temperature conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by International Cooperation Grant I-LINK2014 0946 from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) to JMG, PICT 2015-1198 from ANPCyT, PIP 2015-555 from CONICET and PI04-A128 from Universidad Nacional del Comahue (Argentina) to CAL. YS thank Generalitat Valenciana, respectively, for granting her PhD fellowships.

REFERENCIAS

[1] J. Alonso del Real, M. Lairón Peris, E. Barrio, A. Querol, *Front. Microbiol.*, **2017**, *8*(February).

[2] L. Pérez Travéz, Obtención, estabilización y selección de levaduras híbridas de *Saccharomyces* de interés enológico, *Tesis doctoral*, **2015**, Universitat de Valéncia, Valencia, Spain.

[3] M. Gonzáles Flores, M. E. Rodríguez, J. M. Oteiza, R.J. Barbagelata, C. A. Lopes, *Int. J. Food Microbiol*, **2017**, *249*, 9-17.

USO DE *Torulaspora delbrueckii* COMO COADYUVANTE EN LA ELABORACIÓN DE ESPUMOSO TRADICIONAL

Velázquez Rocío[1], Zamora Emiliano[2], González José A.[1], Regodón José A.[1], Ramírez Manuel [1]*

1 Universidad de Extremadura/ Facultad de Ciencias/ Departamento de Ciencias Biomédicas /Área de Microbiología. Avda de Elvas s/n, Edificio Antiguo Rectorado, 06071 Badajoz.

2 Junta de Extremadura / Estación Enológica. 06200 Almendralejo.

mramirez@unex.es

Resumen. Se pretende mejorar la calidad del vino espumoso tradicional utilizando mezclas de dos levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (una killer y otra sensible), añadiendo como agente floculante levaduras *Torulaspora delbrueckii* (espumoso-To) o bentonita clarificante (espumoso-Ben). Ambas vinificaciones, espumoso-To y -Ben, alcanzaron 6 atm de presión de CO_2 en 60 días, y parte de las levaduras permanecieron viables durante 60-90 días. En ambas fermentaciones hubo desplazamiento de la levadura sensible por la levadura killer, y sólo se contabilizó un porcentaje relevante de levaduras autolisadas durante los primeros 15 días en el espumoso-To, acompañado de más cantidad de polisacáridos respecto al espumoso-Ben. Los parámetros de espuma, altura máxima (HM) y altura de estabilidad (HS), de los espumosos no mejoraron respecto al vino base. No obstante, el tiempo de estabilidad (TS) mejoró en el espumoso-To, en el que además se aceleró la precipitación de las levaduras de forma similar al espumoso-Ben. La bentonita empeoró el TS. El vino mejor evaluado fue el espumoso-To, debido a su mayor intensidad aromática y complejidad, con aromas frutales (isoamil acetato, plátano; e isoamil octanoato, piña-coco) y de crianza (panadería, bollería) más elegantes respecto a los espumosos-Ben, que fueron considerados como cavas más estándares.

En este trabajo se analizó la mejora de la calidad del vino espumoso tradicional utilizando mezclas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) killer y sensibles en la segunda fermentación en botella, como ya se ha descrito previamente [2]. Adicionalmente, se ensayó la influencia de levaduras *Torulaspora delbrueckii* (espumoso-To) como agente floculante para clarificar el vino en sustitución de la bentonita (espumoso-Ben), que es el agente clarificante habitual en la elaboración de cava.

Todas las fermentaciones, espumoso-To y espumoso-Ben, fueron muy eficaces alcanzando 6 atm de presión de CO_2 en 60 días (Figura 1A). Parte de la población de levaduras permaneció viable hasta los 60-90 días, y a los 270 días (9 meses) ya no se contabilizó viabilidad en ninguno de los casos (no mostrado). En todas las condiciones analizadas hubo desplazamiento de la levadura más sensible (killer débil K2) por la levadura más killer (killer Klus), o disminución de las levaduras con el marcador cyh^R (Figura 1B). Esto también en el espumoso-Ben, probablemente debido a que la dosis de bentonita utilizada (0,02%) fue baja y las condiciones de temperatura (18-20ºC durante los primeros 30 días) no fueron tan eficaces para inhibir el efecto de la toxina killer como se ha descrito para vino tranquilo [1]. Sin embargo, a pesar de que hubo efecto killer, sólo se contabilizó un porcentaje relevante de levaduras autolisadas (indicativo de un efecto killer real) durante los primeros 15 días de

segunda fermentación en el espumoso-To, con un 31,3% de células autolisadas (Figura 1C). La cantidad de proteína fue ligeramente mayor en espumoso-To que en el espumoso-Ben (de principio a fin de fermentación), y también la cantidad de polisácaridos hasta el día 90 (Figuras 1D y E).

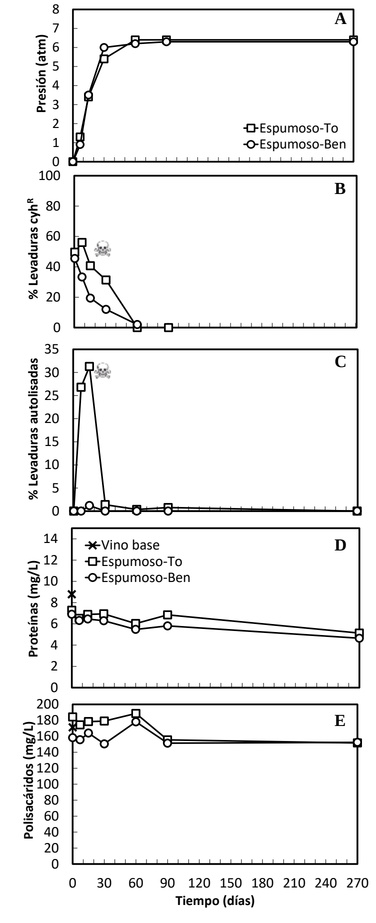


Figura 1: **A**, evolución de la presión. **B**, porcentaje de desplazamiento ó levaduras cyh^R (resistentes a cicloheximida). **C**, porcentaje de células autolisadas. **D**, cantidad de proteínas. **E**, cantidad de polisacáridos.

Los parámetros de espuma, altura máxima (HM) y altura de estabilidad (o espuma estable, HS) de los vinos terminados no mejoraron respecto al vino base. No obstante, el tiempo de estabilidad (TS) sí mejoró en el espumoso-To, en el cual se detectaron más células autolisadas por el efecto killer al principio de fermentación (Tabla 1 y Figura 1C). La bentonita empeoró el TS, probablemente porque secuestró parte de las proteínas del vino que supuestamente mejoran la calidad de la espuma. Sin embargo, la adición de *Torulaspora* en el tiraje mejoró el TS respecto al vino base, probablemente por la presencia de más células autolisadas y polisacáridos liberados durante los primeros días de segunda fermentación (Tabla 1, Figuras 1C y E). Además, la adición de *Torulaspora* aceleró la precipitación de las levaduras de forma similar a la adición de bentonita (no mostrado). Finalmente, el espumoso mejor valorado fue el espumoso-To debido a su mayor intensidad aromática y complejidad, con mayor cantidad de algunos aromas afrutados como isoamil acetato (descriptor: plátano) e isoamil octanoato (piña-coco) y de crianza (panadería, bollería) que resultaron más elegantes respecto a los espumosos-Ben, que fueron considerados cavas más estándar (Tabla 1).

Tabla 1: Algunos parámetros relevantes y calidad organoléptica de los espumosos elaborados con mezclas de levaduras *S. cerevisiae* killer y sensibles, y bentonita o levaduras *Torulaspora* como clarificante.

Parámetros	Vino base	Espumoso-To	Espumoso-Ben
HM (mm)	78,7±5,3	68±16,6	58,5±13,5
HS (mm)	48,7±3,3	22±4,4	12,5±0,9
TS (segundos)	38,3±1,7	148±19,4	8,3±0,8
Isoamil acetato (ppm*×100)/VAO**	-	8,0/3,0	6,0/2,0
Isoamil octanoato (ppm×100)/VAO	-	1,2/1,0	0,4/0,032
Preferencia (%)	-	90	70

*ppm, partes por millón equivale a mg/L; **, VAO, valor de actividad odorante.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto GR18117 financiado por la Junta de Extremadura y Fondo Regional de Desarrollo Europeo. Proyecto AGL2017-87635-R del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (cofinanciado con fondos FEDER). Análisis de aromas realizado por el Servicio de Análisis Elemental y Molecular de la UEx (financiado por la UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER, and FSE).

REFERENCIAS

[1] Pérez, F., Ramírez, M., and Regodón, J. A. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2001**, *79*, 393-399.

[2] Velázquez, R., Zamora, E., Álvarez, M., Álvarez, M. L., Ramírez, M. *Food Microbiol*. **2016**, *59*, 150-160.

SESIÓN 1B. PRODUCTOS LÁCTEOS

AMINAS BIÓGENAS: EL LADO OSCURO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS

Beatriz del Rio, Maria Diaz, Marta Pérez, Begoña Redruello, Daniel M. Linares, Victor Ladero, María Fernández, M. Cruz Martín, Miguel A. Alvarez[1]

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Grupo Microbiología Molecular, Paseo Rio Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias

maag@ipla.csic.es

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son un grupo microbiano imprescindible en la industria alimentaria debido a su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de una gran variedad de alimentos y bebidas fermentados. Además de su papel en la fermentación de los alimentos, algunas cepas son probióticas, produciendo un efecto beneficioso en la salud del consumidor e incluso se ha planteado su uso como vectores vivos para la producción de moléculas terapéuticas en las mucosas. Sin embargo, algunas BAL son responsables de la acumulación de concentraciones tóxicas de aminas biógenas en determinados alimentos.

Las aminas biógenas (AB) son bases orgánicas de bajo peso molecular, termoestables, que desempeñan funciones biológicas muy variadas en prácticamente todos los seres vivos. Las AB intervienen en numerosas e importantes funciones fisiológicas del ser humano, actuando como neurotransmisores, hormonas, participando en el crecimiento, multiplicación y diferenciación celular, etc. Sin embargo, debido al metabolismo microbiano, algunas AB como la histamina, la tiramina, la putrescina y la cadaverina pueden acumularse en altas concentraciones en determinados alimentos y su ingesta es un riesgo para la salud del consumidor. La mayoría de las AB se producen por descarboxilación de los correspondientes aminoácidos precursores. Así, por ejemplo, la histamina y la tiramina se forman por descarboxilación de los aminoácidos histidina y tirosina respectivamente (Figura 1).

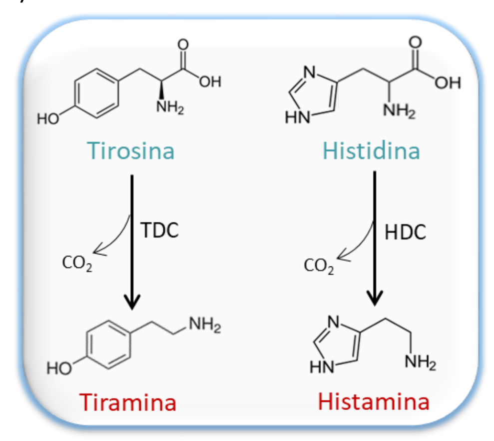


Figura 1: Biosíntesis de las AB

En condiciones normales, las AB ingeridas en la dieta son rápidamente metabolizadas en la mucosa intestinal para dar lugar a productos de degradación menos activos fisiológicamente. Sin embargo, estos sistemas de destoxificación pueden ser insuficientes debido a una predisposición genética, a la influencia de compuestos inhibidores como es el caso de algunos antidepresivos o el tabaco, o simplemente porque se ingieran alimentos con concentraciones de AB tan elevadas que provoquen su saturación. En cualquier caso, las AB pasan al sistema circulatorio causando una serie de efectos tóxicos que varían dependiendo de cada amina [1]. Un aspecto importante en la toxicidad de las AB es que, en algunos alimentos como el queso, pueden acumularse altas concentraciones de varias AB que tras su ingestión van a competir entre sí por las enzimas de la mucosa intestinal

aumentando su toxicidad. Además, recientemente hemos comprobado que la histamina y la tiramina tienen un efecto citotóxico sinérgico [2].

Las AB se acumulan principalmente en pescado y en alimentos fermentados. En pescado, las principales bacterias productoras de AB son bacterias Gram negativas contaminantes y que en su mayoría producen histamina (*Morganella morganii, Klebsiella pneumoniae, Hafnia alvei o Proteus vulgaris*). El consumo de pescado fresco, sometido a una manipulación y conservación adecuadas, es la solución al problema. Sin embargo, en productos fermentados, las principales productoras de AB son bacterias Gram positivas del grupo de las BAL. Las BAL son responsables de la fermentación y de las características organolépticas de muchos alimentos fermentados, por lo que la solución del problema es más complicada. Un alimento en el que se acumulan muy altas concentraciones de AB es el queso, siendo la tiramina, la histamina y la putrescina las que aparecen más frecuentemente y en mayores concentraciones. En los últimos años, nuestro grupo ha hecho un gran esfuerzo para investigar y esclarecer los factores implicados en la biosíntesis y acumulación de AB en queso, y que son fundamentalmente tres (para revisión ver [3]): 1) los microorganismos productores, que como en otros alimentos fermentados son principalmente BAL, 2) los aminoácidos, que son el sustrato de la reacción y además inducen los genes responsables de su biosíntesis y 3) las condiciones fisicoquímicas que afectan el crecimiento de los microorganismos productores, la expresión de los genes implicados y la actividad de los enzimas.

A lo largo de esta ponencia se revisarán principalmente los trabajos relacionados con las BAL productoras de AB en queso. Mediante técnicas dependiente e independientes de cultivo hemos identificado *Enterococcus faecalis* como el principal productor de tiramina, *Lactobacillus parabuchneri* de histamina y *E. faecalis* y *Lactococcus lactis* como los principales productores de putrescina. Posteriormente, hemos estudiado la función fisiologica y la regulación genética de las rutas de biosíntesis. Los resultados obtenidos nos permitieron el desarrollo de métodos independientes de cultivo para la identificación rápida de bacterias productoras de AB en el queso, lo que permite discriminar iniciadores potencialmente productores, conocer cómo estas BAL se han pasado “al lado oscuro”, sus puertas de entrada en las queserías, la evolución dinámica de la población a lo largo de la fabricación del queso, etc. También se presentarán métodos específicos para controlar sus poblaciones y evitar la acumulación de AB en los alimentos, sin afectar la microbiota responsable de las características organolépticas deseadas. El objetivo final de estos trabajos es impedir la acumulación de AB en queso, evitando la presencia de las cepas productoras a lo largo de la cadena alimentaria, y en aquellos casos donde esto no sea posible, evitando su biosíntesis o favoreciendo su degradación durante la fabricación y almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Estos tabajos están financiados en la actualidad por el Proyecto AGL2016-78708-R del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación

REFERENCIAS

[1] V Ladero, M Calles-Enríquez, M Fernández y MA Alvarez, *Curr. Nutr. Food Sci.*, **2010**, *6*, 145-156.

[2] B del Rio, B Redruello, DM Linares, V Ladero, M Fernandez, MC Martin, P Ruas-Madiedo y MA Alvarez, *Food Chem.*, **2017**, *218*, 249-255.

[3] DM Linares, B del Rio, V Ladero, N Martínez, M Fernández, MC Martín y MA Alvarez, *Front. Microbiol.,* **2012**, *3*, 180.

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS Y MICROBIOLOGÍA DE QUESOS TRADICIONALES

Mayo B.
Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, IPLA-CSIC, Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias
baltasar.mayo@ipla.csic.es

Microbiología del queso

España cuenta con un gran número de quesos tradicionales de reputada fama de los cuales muchos están protegidos con sellos de denominaciones de origen (DOP) o indicaciones geográficas (IGP).

Las propiedades sensoriales de estos productos dependen de factores como la especie de procedencia de la leche, la alimentación de los animales y las prácticas y tecnologías de elaboración y maduración. Tiene un papel destacado también la composición cualitativa y cuantitativa de los microorganismos responsables de los procesos de acidificación y afinado. El queso es un ecosistema complejo en el que se desarrollan muchas poblaciones microbianas, incluyendo patógenos.

La identificación y caracterización de la microbiota del queso es pues esencial para reproducir y controlar las fermentaciones tradicionales, emprender otras nuevas y garantizar la seguridad alimentaria.

Técnicas de cultivo

La fermentación espontánea de la leche la llevan a cabo bacterias ácido-lácticas de los géneros *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc* y *Pediococcus*. Junto con los procesos tecnológicos, el resultado de las actividades de esos microorganismos da lugar a sus cualidades sensoriales, de seguridad higiénica y conservación.

La acidificación espontánea de la leche conduce, en ocasiones, a productos con características poco uniformes y con defectos y alteraciones. Este hecho, unido a la universalización de la Pasteurización a mediados del siglo pasado y el empleo de la refrigeración de la leche en tiempos más recientes, ha hecho necesario sustituir la acidificación espontánea por la inoculación con grandes cantidades de los microorganismos acidificadores, llamados cultivos iniciadores o fermentos. De manera amplia, el término incluye también cualquier microorganismo que se añade a la leche de manera deliberada (mohos, brevibacterias, propionibacterias, etc.). Los fermentos tienen como funciones principales (i) la producción de ácido láctico a partir de la lactosa, (ii) la producción de enzimas con actividad proteolítica y lipolítica, (iii) la producción de compuestos aromáticos volátiles y (iv) la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y alterantes mediante antagonismo microbiano.

La selección de microorganismos para su utilización como fermentos requiere su recuperación en cultivo con vistas a su identificación y caracterización previas a su empleo [1-5].

Técnicas independientes de cultivo

En muchos nichos ecológicos numerosas especies microbianas en diversas condiciones de viabilidad interactúan y compiten por espacio y nutrientes. En ocasiones las técnicas de cultivo clásicas subestiman la diversidad y no son capaces de cuantificar ni siquiera los grupos mayoritarios. Las dificultades para cultivar un tipo microbiano pueden deberse a la necesidad de factores de crecimiento desconocidos, la relación de dependencia con otros microbios del entorno, un estado fisiológico no cultivable, etc. Para paliar estas limitaciones, se han desarrollado técnicas independientes de cultivo para la detección y cuantificación microbianas.

En las décadas estos métodos se han aplicado también a la microbiología del queso y otros productos lácteos. Con ellos se identifican los componentes de la microbiota y se estudia la dinámica de poblaciones a lo largo de los procesos de elaboración y maduración.

Técnica de la DGGE

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) es una técnica que se basa en la separación electroforética de moléculas de ADN de doble cadena amplificadas mediante PCR en un gel de poliacrilamida desnaturalizante. La separación de los productos de amplificación se realiza sobre la base de la reducción de la movilidad electroforética de una cadena de ADN doble cuando está parcialmente desnaturalizada. La desnaturalización progresiva durante la electroforesis depende de la secuencia lo que permite diferenciar amplicones de igual tamaño.

Mediante la utilización de determinados cebadores, con la DGGE se pueden estudiar las poblaciones bacterianas, las eucariotas, o grupos específicos [3,4].

Técnicas de secuenciación masiva

En la actualidad existen varias tecnologías de secuenciación masiva de ácidos nucleicos (técnicas genómicas, metagenómicas y metatranscriptómicas) para abordar el estudio de la diversidad microbiana (microbiota) del queso, su evolución a lo largo del tiempo y el estudio de su potencialidad genética (y por tanto bioquímica) de sus componentes (microbioma). Su aplicación a la caracterización de los productos lácteos está descubriendo una infinidad de tipos, incluyendo los más abundantes y otros subdominantes y minoritarios con gran importancia en la producción de compuestos de aroma y sabor [4,5]. La utilización combinada de estas tecnologías, junto con las técnicas analíticas de metabolitos más avanzadas (metabolómicas), proporcionarán datos valiosos para el conocimiento de todos los biotipos, sus relaciones y sus funciones, lo que posibilitará el desarrollo de estrategias para la promoción específica de los biotipos beneficiosos y la inhibición de los tipos indeseables.

En esta ponencia se dará cuenta de los resultados que nuestro grupo de investigación ha conseguido en la caracterización microbiana de quesos tradicionales de España y de otros países mediante la utilización independiente o combinada de las técnicas microbiológicas mencionadas.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos referenciados se llevaron a cabo mediante proyectos financiados con cargo a planes de investigación nacionales (OTR1995-0556-OP; RF02-019; AGL2007-61869-ALI) y regionales (GRUPIN14-137).

REFERENCIAS

[1] Estepar J, Sánchez MM, Alonso L, Mayo, B. *Int. Dairy J.,* **1999***, 9*:737-746.

[2] Flórez AB, Álvarez-Martín P, López-Díaz TM, Mayo, B. *Eur. Food Res. Technol.,* **2006**, *223*: 503-508.

[3] Alegría A, Álvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. *Int. J. Food Microbiol.,* **2009**, *136*: 44-51.

[4] Alegría A, Szczesny P, Mayo B, Bardowski J, Kowalczyk M. *Appl. Environ. Microbiol.,* **2012***, 78*: 1890-1898.

[5] Delgado D, Rachid CTCC, Fernández E, Rychlik T, Alegría A, Peixoto RS, Mayo B. *Food Microbiol.,* **2013***, 36*: 103-111.

TRATAMIENTOS DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN PRODUCTOS LÁCTEOS

Picón A.
INIA - Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de A Coruña Km 7, 28040 Madrid
apicon@inia.es

El tratamiento de alimentos por altas presiones hidrostáticas (APH) es una de las tecnologías emergentes que más se ha desarrollado en los últimos años, favorecida por la percepción positiva por parte del consumidor [1], y constituye una alternativa viable a los tratamientos térmicos [2]. La presión aplicada se transmite instantánea y uniformemente al producto con un aumento de temperatura reducido [3].

Una de las principales ventajas de los tratamientos por APH es la mejora de la seguridad microbiológica del producto y la prolongación de su vida útil debido a la inactivación de microorganismos patógenos y alterantes. Esta perdida de viabilidad debida a las APH es el resultado de varios daños celulares (efectos sobre la pared celular, la membrana celular y las enzimas microbianas). La eficacia bactericida del tratamiento de APH depende de la presión aplicada, el tiempo de tratamiento, la temperatura, la composición de la matriz, el tipo de microorganismo, así como su temperatura y fase de crecimiento [2].

La leche tiene un efecto baroprotector sobre los microorganismos: la inactivación de *E. coli* MG1655 en tampón fosfato y en leche a 600 MPa durante 15 minutos a 20°C dio lugar a reducciones de 8,3 y 1,6 unidades logarítmicas, respectivamente [4]. Este efecto baroprotector parece ser debido a las caseínas y no a la grasa, ya que una solución tampón suplementada con caseina mostró un efecto baroprotector equivalente al de la leche [5]. Sin embargo, *L. monocytogenes* sobrevivió mejor a un tratamiento a 600 MPa durante 90 segundos, en leche desnatada que en leche entera [6].

Las combinaciones de tratamientos de APH con compuestos antimicrobianos o cultivos productores de compuestos antimicrobianos ha permitido aumentar la inactivación de microorganismos patógenos [7].

En quesos, los tratamientos de APH, aplicados en diferentes momentos de la maduración, han conseguido la inactivación o reducciones significativas de los niveles de microrganismos patógenos y alterantes. En queso Sainte Maure de 14 días contaminado con *L. monocytogenes* F13, se obtuvieron reducciones del patógeno de más de 5,6 unidades logarítmicas con tratamientos de 450 MPa durante 10 minutos o 500 MPa durante 5 minutos [8]. Los patógenos Gram-negativos, como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella*, son menos barorresistentes que *Listeria*, y así en quesos de leche cruda inoculada con *E. coli* O157:H7 de 2 y 50 días de maduración se consiguieron reducciones de 3,8 y más de 6 unidades logarítmicas al aplicarles tratamientos de 300 MPa durante 10 minutos o 500 MPa durante 5 minutos, respectivamente [9]. También se ha investigado las combinaciones de tratamientos de APH con compuestos antimicrobianos o bacterias lácticas productoras de estos compuestos, buscando efectos sinérgicos. El efecto letal sobre *E. coli* O157:H7 aumentó entre 2,1 y 3,2 unidades logarítmicas al utilizar cultivos lácticos productores de bacteriocinas [9].

Otra aplicación de los tratamientos de APH ha sido el desarrollo de un procedimiento que permite la elaboración de queso Hispánico (fabricado con leche de vaca y oveja) evitando la estacionalidad de la leche de oveja. Este procedimiento utiliza

cuajada de oveja tratada por APH y congelada, obteniendose un queso con una composición constante y sin alterar sus características sensoriales [10].

Los tratamientos de APH también han sido utilizados para reducir la producción de aminas biógenas en quesos de leche cruda. La concentración de aminas en queso control fue de 1,089 mg / g de extracto seco a los 60 días y siguió aumentando hasta 3,690 mg / g de extracto seco a los 240 días, siendo las aminas más abundantes tiramina, putrescina y cadaverina. En quesos experimentales sometidos a tratamientos de APH a los 21 o 35 días, la concentración de aminas se redujo entre 27 y 33% en quesos tratados a 400 MPa y entre 40 y 65% en quesos tratados a 600 MPa a los 60 días y entre 11 y 45% en quesos tratados a 400 MPa y entre 73 y 76% en quesos tratados a 600 MPa a los 240 días [11]. La aplicación de estos tratamientos redujo la proteolisis y evitó la sobremaduración y la perdida de calidad sensorial que experimentaron los quesos control durante su almacenamiento en refrigeración durante varios meses (practica habitual debido a la estacionalidad del producto). El tratamiento de APH a 600 MPa fue muy efectivo en disminuir la degradación de proteinas y formación de péptidos y aminoácidos libres durante el almacenamiento en refrigeración. Los quesos tratados por APH mantuvieron las puntuaciones de calidad de sabor obtenidas a los 60 días hasta los 240 días de maduración [12].

La hinchazón tardía, o fermentación butírica, es un defecto de origen microbiológico que aparece en quesos semiduros y duros, y da lugar a defectos de textura, aroma y sabor, que suponen grandes pérdidas económicas. Se produce como consecuencia del crecimiento en el interior del queso de algunas especies del género *Clostridium* capaces de fermentar el ácido láctico con producción de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno, con aparición de ojos irregulares y grietas en la matriz del queso y, a veces acompañadas de un sabor y olor rancio y desagradable. Debido a la ubicuidad y la naturaleza resistente de las esporas de *Clostridium*, es dificil evitar este tipo de alteración ya que un bajo número de esporas en la leche pueden causar el defecto si las condiciones en el queso son adecuadas para la germinación y crecimiento de *Clostridium*. Durante la elaboración de queso con leche contaminada con esporas de *C. tyrobutyricum*, se observó que se producía la germinación de las esporas durante el prensado de los quesos. La aplicación de un solo ciclo de APH igual o superior a 300 MPa a los 7 días de maduración, permitió prevenir la hinchazón tardía al inactivar las células vegetativas de *C. tyrobutyricum*, metabólicamente activas, procedentes de la germinación. Los quesos presurizados a 200-400 MPa obtuvieron unas puntuaciones similares al queso control para la intensidad y calidad del olor, aroma y sabor, calidad de textura y calidad de color tras ser evaluados por un panel de catadores [13].

REFERENCIAS

[1] Cardello AV, Schutz HG, Lesher LL. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2007**, *8*, 73-83.
[2] Patterson MF. *J. Appl. Microbiol.*, **2005**, *98*, 1400-1409.
[3] Wilson DR, et al. *Trends Food Sci. Technol.*, **2008**, *19*, 289-299.
[4] García-Graells C, Masschalck B, Michiels CW. *J. Food Protect.*, **1999**, *62*, 1248-1254.
[5] Ramaswamy HS, Jin H, Zhu SM. *Food Bioprod. Process.*, **2009**, *87*, 1-6.
[6] Bull MK, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2005**, *101*, 53-61.
[7] Medina M, Nuñez M. Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation, (Woodhead Publishing Limited, **2010**, 267-296).
[8] Gallot-Lavallée T. *Sciences des Aliments*, **1998**, *18*, 647-655.
[9] Rodriguez E, et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, *71*, 3399-3404.
[10] Alonso R, et al. *Int. Dairy J.*, **2011**, *21*, 484-492.
[11] Calzada J, et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2013**, *79*, 1277-1283.
[12] Calzada J, et al. *Food Bioprocess Technol.*, **2014**, *7*, 1404-1413.
[13] Ávila M, et al. *Food Microbiol.*, **2016**, *60*, 165-173.

INFLUENCIA DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN, ÉPOCA DEL AÑO Y TIEMPO DE MADURACIÓN SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL QUESO DE OVEJA

González L.[1], Fernández D.[2], Renes E. [1], Tornadijo M.E.[1], Fresno J.M.[1]

1 Universidad de León/Facultad de Veterinaria/Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos/Área de Tecnología de los Alimentos. Campus de Vegazana, S/N - 24071- León.

2 Universidad de León/Instituto Ciencia y Tecnología de Alimentos/La Serna, 58 - 24007 - León.

jmfreb@unileon.es

El objetivo de este trabajo fue conocer la influencia que la alimentación, el tiempo de maduración y la época del año ejercieron sobre las características microbiológicas del queso de oveja.

Se elaboraron varios lotes de queso en las diferentes épocas del año (verano, otoño, invierno y primavera) con leche procedente de animales alimentados de forma diferente: a base de pasto-forraje (4 lotes en cada época) y de ensilado (otros 4 lotes en cada época del año). Los quesos fueron madurados durante un periodo de 180 días. Se tomaron muestras de los quesos elaborados tanto con la leche procedente de animales alimentados con ensilado como con pasto-forraje en las diferentes épocas del año, a los 7, 90 y 180 días de la maduración, con objeto de realizar los recuentos de los siguientes grupos microbianos: microbiota aerobia mesófila total (tras siembra del inóculo en PCA e incubación a 30ºC durante 48 h), psicrotrofos (en PCA, 7ºC/10 días), bacterias lácticas en general (en agar MRS, 30ºC/72 h), lactobacilos en particular (en agar ROGOSA, 30ºC/ 5 días), enterococos (en KAA, 37ºC/24-48 h), enterobacterias (en VRBGA, 37ºC, 18-24 h) y mohos y levaduras (en OGYEA, 25ºC/ 5 días).

Los resultados se muestran en las Tablas 1 y 2. Al inicio de la maduración de los quesos y hasta los 90 días de la misma, los recuentos microbianos fueron similares en los quesos elaborados con distinto tipo de alimentación. No obstante, al final de la maduración (180 días) los recuentos fueron ligeramente superiores en los quesos elaborados con la leche de los animales alimentados a base de ensilado, en los que se alcanzaron recuentos superiores a 6 log ufc/g para los microorganismos mesófilos totales y para las bacterias lácticas.

Por lo que se refiere a la influencia de la época del año, se pudo observar que al término de la maduración, los recuentos de los quesos elaborados en otoño e invierno fueron más altos que los de primavera y verano, independientemente del tipo de alimentación empleada, con diferencias de 1 a 2 unidades logarítmicas. En relación con ello cabe señalar que los quesos de verano presentaron, por lo general, valores más bajos de humedad, a_w y pH (datos no mostrados) que el resto de lotes.

Se realizó también un análisis de presencia de *Clostridium tyrobutiricum*, microorganismo responsable de la aparición de problemas de hinchazón tardía en quesos madurados. A este respecto, los lotes elaborados en verano y como era de esperar los procedentes de leche de ovejas alimentades con ensilado, mostraron mayores recuentos, en concordancia con resultados obtenidos por Garde y col. [1].

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad e INIA (referencia RTA2014-00069-CO2-02).

REFERENCIAS

[1] Garde S., Arias R., Gaya, P., Núñez, M. *Int. Dairy J.* **2011**, *21*, 272-278.

	Alimentación Estación	Días de maduración		
		7	90	180
PCA_m	EN V	9,57 ± 0,12	6,73 ± 0,46	4,77 ± 0,32
	EN O	9,84 ± 0,20	7,95 ± 0,87	6,69 ± 0,33
	PF V	9,55 ± 0,20	6,50 ± 0,13	3,81 ± 0,30
	PF O	9,82 ± 0,15	6,94 ± 0,72	5,99 ± 1,11
PCA_p	EN V	9,37 ± 0,42	4,35 ± 3,03	-
	EN O	9,86 ± 0,14	-	4,04 ± 2,74
	PF V	9,56 ± 0,20	4,12 ± 2,96	0,69 ±1,37
	PF O	6,78 ± 4,59	-	1,89 ± 2,30
MRS	EN V	9,60 ± 0,11	5,94 ±0,34	4,54 ± 0,31
	EN O	9,84 ± 0,13	6,46 ±0,33	6,38 ± 0,54
	PF V	9,59 ± 0,13	5,65 ± 1,09	3,20 ± 0,47
	PF O	9,81 ± 0,17	5,70 ± 0,71	5,48 ± 1,25
ROGOSA	EN V	2,18 ± 0,60	4,71 ± 0,81	3,83 ± 0,56
	EN O	2,03 ± 0,70	5,70 ± 0,95	5,51 ± 1,20
	PF V	2,27 ± 0,74	4,02 ± 1,06	2,88 ± 0,71
	PF O	2,32 ± 0,83	5,42 ±0,92	5,15 ± 1,31
KAA	EN V	1,56 ± 1,34	1,10 ± 1,27	1,38 ± 1,00
	EN O	2,68 ± 0,25	2,69 ±0,28	2,62 ± 0,31
	PF V	0,71 ± 0,86	0,79 ± 0,95	0,99 ± 0,67
	PF O	2,52 ± 1,03	2,26 ± 1,52	2,12 ± 1,42
VRBGA	EN V	2,83 ± 1,21	1,22 ± 1,47	-
	EN O	0,88 ± 1,06	-	-
	PF V	3,23 ± 1,18	1,22 ± 0,86	-
	PF O	1,89 ± 0,75	-	-
OGYEA	EN V	1,29 ± 0,94	1,08 ± 2,18	2,00 ± 1,84
	EN O	1,48 ± 1,35	-	0,41 ± 0,82
	PF V	0,95 ± 1,24	1,09 ±2,20	0,68 ± 1,37
	PF O	1,63 ± 1,47	-	0,28 ± 0,55

Tabla 1.- Evolución en los recuentos medios microbianos (log ufc/g) durante la maduración de los lotes elaborados en verano (V) en otoño (O). Se presentan los valores medios de los 4 lotes elaborados con leche de las ovejas alimentadas con ensilado (EN) y de los otros 4 correspondientes a pienso y forraje (PF) en cada época del año.

	Alimentación Estación	Días de maduración		
		7	90	180
PCA_m	EN I	9,38 ± 0,18	6,43 ± 0,11	5,90 ± 0,69
	EN P	8,86 ± 0,23	5,34 ± 0,68	3,97 ± 0,59
	PF I	9,38 ± 0,11	6,39 ± 0,34	5,77 ± 0,79
	PF P	9,23 ± 0,24	5,25 ± 0,35	3,79 ± 0,35
PCA_p	EN I	9,31 ± 0,15	6,57 ±0,25	5,38 ±0,54
	EN P	8,27 ± 0,67	4,95 ± 0,88	3,71 ± 0,38
	PF I	8,41 ± 0,48	6,24 ± 0,52	5,28 ± 0,71
	PF P	8,69 ± 0,68	4,60 ± 0,77	2,60 ± 1,03
MRS	EN I	8,64 ± 0,59	6,74 ± 0,32	6,57 ± 0,47
	EN P	8,76 ± 0,58	5,42 ± 0,69	4,01 ± 0,38
	PF I	8,17 ± 0,58	6,26 ± 0,75	5,53 ± 0,83
	PF P	8,77 ± 0,51	5,27 ± 0,42	4,09 ± 0,51
ROGOSA	EN I	1,18 ± 0,47	5,63 ± 0,76	6,26 ± 0,81
	EN P	1,65 ± 0,53	4,99 ± 0,86	2,97 ± 1,94
	PF I	1,17 ± 0,36	4,83 ± 0,74	5,34 ± 0,96
	PF P	2,30 ± 0,61	4,72 ± 0,92	2,55 ± 1,80
KAA	EN I	2,47 ± 0,20	2,60 ± 0,24	2,56 ± 0,15
	EN P	3,04 ± 0,31	3,03 ±0,34	3,23 ± 0,50
	PF I	2,37 ± 0,42	2,04 ± 1,19	1,91 ± 1,11
	PF P	2,86 ± 0,59	2,95 ± 0,52	2,83 ± 0,56
VRBGA	EN I	1,48 ± 1,48	-	-
	EN P	1,35 ± 0,96	1,16 ± 1,40	-
	PF I	1,91 ± 1,23	-	-
	PF P	1,12 ± 1,16	1,49 ± 1,50	-
OGYEA	EN I	-	-	0,30 ± 0,51
	EN P	0,65 ± 0,66	-	-
	PF I	0,95 ± 1,24	1,09 ±2,20	0,68 ±1,37
	PF P	0,58 ± 0,58	0,4 ± 0,69	-

Tabla 2.- Evolución en los recuentos medios microbianos (log ufc/g) durante la maduración de los lotes elaborados en invierno (I) y primavera (P). Se presentan los valores medios de los 4 lotes elaborados con leche de las ovejas alimentadas con ensilado (EN) y de los otros 4 correspondientes a pienso y forraje (PF) en cada época del año.

COMPORTAMIENTO DE *E. coli* PATÓGENOS (STEC Y aEPEC) EN QUESO MADURADO ELABORADO CON LECHE CRUDA DE VACA

Rios Edson Antonio, Ramos Pereira Juliana, Otero Andrés, Rodríguez-Calleja Jose M.
Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria,
Universidad de León, España,
jm.rcalleja@unileon.es

Introducción

La leche puede contaminarse por microorganismos patógenos durante su obtención o transformación y, por tanto, constituir un peligro en los productos lácteos elaborados a partir de leche no tratada térmicamente. Entre estos microorganismos, son destacables *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y *E. coli* enteropatogénico atípico (aEPEC). Este trabajo se llevó a cabo para determinar el comportamiento de cepas de *E. coli* con características de patogenicidad y de origen lácteo durante los procesos de elaboración y maduración de queso elaborado a partir de leche cruda de vaca.

Material y Métodos

Fueron preparados dos quesos de tipo castellano y pasta prensada. Para cada queso (*ca.* 900 g) se utilizaron 10 litros de leche cruda de vaca que intencionadamente se contaminó con *ca.* 10^3 ufc/ml de dos cepas de *E. coli* de origen lácteo (cepa de STEC MK116C19, serotipo O140:H32; cepa de aEPEC MK127C9, serotipo ONT:H2), seleccionadas previamente por su buena capacidad de adaptación a las condiciones intrínsecas de los quesos. El cultivo iniciador utilizado estuvo compuesto por cepas liofilizadas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* y *Streptococcus thermophilus* (CHOOZITTM MA 4001 LYO 5 DCU, Danisco). Se tomaron muestras en distintas fases del proceso de producción del queso para la cuantificación de ambas cepas de *E. coli*. Los recuentos fueron realizados en el medio Tryptone Bile X-glucuronide (TBX). Después de una incubación a 37 ºC durante 24 horas, las colonias blancas de 1,5-2 mm de diámetro fueron asociadas a la cepa de aEPEC (beta-glucoronidasa negativa), y las colonias azules de 1,5-2 mm de diámetro a la cepa de STEC (beta-glucoronidasa positiva). Aleatoriamente, varias colonias de cada tipología fueron confirmadas por PCR mediante la detección de los genes *stx* y *eae*. Cada análisis se realizó por sextuplicado.

Los recuentos microbianos fueron transformados a unidades logarítmicas (log_{10}) para realizar un análisis de varianza (ANOVA) que determinara el efecto de cada etapa de procesado (prueba de Tukey). Además, fue comparada la evolución de las poblaciones medias de las cepas mediante la prueba de *t-student*. El análisis fue realizado con el programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0.

Resultados y Discusión

La Tabla 1 muestra la evolución de las poblaciones de las cepas de aEPEC y STEC durante los procesos de elaboración y maduración de los quesos. En el momento de la inoculación de la leche, el recuento de la cepa de STEC fue de 3,14 log ufc/ml y el nivel de la cepa de aEPEC alcanzó 3,49 log ufc/ml, sin diferencias significativas entre ambos recuentos ($p>0,05$). Los números de ambas cepas aumentaron en las primeras etapas de fabricación del queso hasta la etapa de salado y escurrido (tiempo cero de maduración). Este incremento puede ser atribuido a las condiciones favorables de multiplicación, temperatura (~37ºC) y pH (>5) originadas durante las primeras etapas [1].

Especialmente relevante fue el significativo incremento (p<0,05) del nivel de ambas cepas (1,41 y 1,24 log ufc/g para STEC y aEPEC, respectivamente) hasta el prensado, a partir del cual comenzó el descenso de la concentración de ambas cepas, especialmente intenso en la población de STEC (Tabla 1). El incremento inicial se puede justificar, además de por las condiciones favorables de crecimiento, por la concentración bacteriana del cuajado, produciendo una barrera física en la cuajada que atrapa a las bacterias mientras se expulsa el suero, que ha sido indicada como de hasta diez veces (Maher et al., 2001).

Tabla 1. Evolución de los recuentos de las poblaciones de STEC (cepa MK116C19) y aEPEC (MK127C9) durante el proceso de elaboración y maduración de queso elaborado con leche cruda de vaca inoculada con dichas cepas.

Fase de producción	**Recuento**	
	STEC	aEPEC
Leche inoculada	^{ab}3,14 ±0,44^{A}	^{A}3,49 ±0,28^{a}
Incubación inicial	^{be}3,67 ±0,20^{B}	^{A}4,11 ±0,16^{b}
Cuajada	^{c}4,74 ±0,17^{A}	^{A}4,55 ±0,16^{c}
Tras prensado	^{cd}4,55 ±0,54^{A}	^{A}4,73 ±0,17^{c}
Tras salado y escurrido	^{de}4,12 ±0,25^{B}	^{A}4,65 ±0,12^{c}
Maduración:		
Día 7	^{de}4,04 ±0,11^{B}	^{A}4,63 ±0,06^{c}
Día 15	^{be}3,61 ±0,18^{B}	^{A}4,53 ±0,08^{c}
Día 30	^{a}2,96 ±0,17^{B}	^{A}3,96 ±0,13^{b}
Día 45	^{f}1,81 ±0,36^{B}	^{A}3,06 ±0,21^{d}
Día 60	^{f}1,82 ±0,21^{B}	^{A}2,90 ±0,18^{d}
Día 90	^{g}0,88 ±0,20^{B}	^{A}2,11 ±0,23^{e}

En una columna, los recuentos con superíndices que presenten igual letra minúscula no muestran diferencias significativas (p>0,05). En una fila, los recuentos con superíndices que presenten igual letra mayúscula no muestran diferencias significativas (p>0,05). Los valores promedios (log ufc/ml o log ufc/g) y sus desviaciones estándar son el resultado de seis determinaciones.

En la Figura 1 se observa la reducción de las poblaciones de las cepas de STEC y aEPEC estudiadas desde el salado-escurrido y a lo largo de la maduración del queso. Durante ésta, la población de la cepa de STEC MK116C19 se redujo en 1,16 log ufc/g a los 30 días, recuperando el nivel inicial de inoculación (Tabla 1). Por su lado, la cepa de aEPEC MK127C9 fue menos afectada por el proceso de maduración, ya que solo a partir de los 45 días de maduración su concentración se redujo en 1,59 log ufc/g hasta alcanzar el nivel de contaminación inicial de la leche (Tabla 1). Durante los 90 días de maduración de los quesos, las poblaciones de las cepas de STEC y aEPEC se redujeron en 3,24 y 2,54 log ufc/g, respectivamente (Figura 1), aunque al final de este periodo todavía fueron detectables mediante recuento en placa (STEC MK116C19, 0,88 log ufc/g; aEPEC MK127C9, 2,11 log ufc/g; Tabla 1). Así pues, se observa una mayor resistencia de la cepa de aEPEC consecuencia de una mejor capacidad de adaptación a las condiciones intrínsecas a lo largo del proceso productivo del queso.

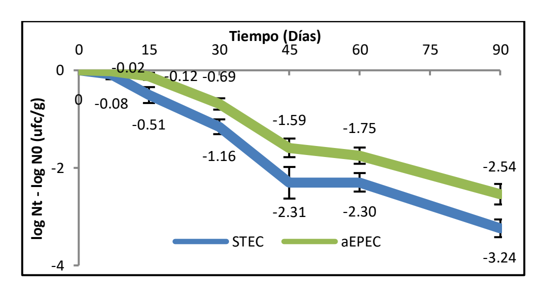


Figura 1. Reducción de la población de la cepa de STEC MK116C19 (O140:H32) y de la cepa de aEPEC MK127C9 (ONT:H2) a lo largo de la maduración del queso con relación al valor poblacional de cada cepa al inicio de la misma. En cada punto se presenta el valor promedio de seis análisis y su desviación estándar.

Conclusiones

Los procesos convencionales de elaboración y maduración del queso obtenido a partir de leche cruda de vaca no garantizan la inactivación de cepas STEC no-O157 y aEPEC cuando se elabora queso con leche contaminada con niveles altos (ca. 10^3 ufc/g) de dichas bacterias, ya que siguen detectándose significativamente después de 90 días de maduración, siendo especialmente significativa la capacidad de supervivencia de aEPEC.

AGRADECIMIENTOS

Edson Antonio Rios fue beneficiario de una beca de investigación del CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil. Se agradece también la financiación parcial del Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyecto AGL2011 – 26118) y de la Universidad de León.

REFERENCIAS

[1] Maher, et al. *Appl. Microbiol*. **2001**, *90*, 201–7.

TRANSFERENCIA DE AFLATOXINAS DESDE LA RACIÓN *UNIFEED* A LA LECHE EN GANADO VACUNO LECHERO

Rodríguez-Blanco M., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J.
Unidad de Micología Aplicada, Dpto. de Tecnología de Alimentos, Universitat de Lleida, UTPV-XaRTA, Agrotecnio Center, Av. Rovira Roure 191, Lleida, España.
ajramos@tecal.udl.cat

Las aflatoxinas (AFs) son metabolitos secundarios tóxicos producidos por mohos del género *Aspergillus* siendo *A. flavus* y *A. parasiticus* las principales especies responsables de su presencia en alimentos y piensos. La aflatoxina B_1 (AFB_1) es el más potente carcinógeno natural conocido, por lo que ha sido clasificado por la IARC como agente carcinógeno para los seres humanos (Grupo 1) [1]. La aflatoxina M_1 (AFM_1) es el metabolito hidroxilado de la AFB_1, y puede ser excretado en la leche de vacas que han consumido pienso contaminado por AFB_1. La AFM_1 es menos tóxica que la AFB_1 y ha sido clasificada por la IARC como posible carcinógeno para los seres humanos (Grupo 2B). Debido a su toxicidad, la UE ha establecido un límite de AFB_1 en pienso completo para ganado vacuno lechero de 5,0 µg/kg [2] y de 0,05 µg/ kg de AFM_1 en leche cruda.
El maíz, el trigo o la semilla de algodón constituyen una potencial fuente de micotoxinas. Las AFs también pueden proceder de piensos compuestos, granos o productos de soja, tortas de presión de distintas oleaginosas como cacahuetes, semillas de girasol, semillas de algodón, granos de palma y copra, o de otros ingredientes como ensilado, heno y paja [3]. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de AFs en muestras de ración *unifeed* para ganado vacuno lechero, y de AFM_1 en leche procedente de los ordeños realizados a las 24 h y a las 48 h tras consumir la ración. Además, se analizó la transferencia de AFs desde la ración *unifeed* a la leche y se estableció la posible correlación entre la composición de la ración *unifeed* y la presencia de AFs.
Desde febrero de 2016 hasta enero de 2018 se analizaron 193 muestras de ración *unifeed* y 385 muestras de leche procedentes de diferentes zonas de España. Las muestras de *unifeed* se analizaron mediante un método validado en el laboratorio. Antes del análisis, se secaron a 60 °C durante 24 horas y se molieron hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se extrajeron y purificaron mediante columnas de inmunoafinidad Easi-extract® Aflatoxin (R-Biopharm, Rhône LTD). Por último, se analizaron mediante UHPLC-FLD. Por otro lado, las muestras de leche se extrajeron y purificaron con columnas de inmunoafinidad Aflaprep® M Wide (R-Biopharm, Rhône, LTD) y se analizaron mediante UHPLC-FLD para determinar la presencia de AFM_1.

Del total de muestras analizadas, 67 muestras de *unifeed* resultaron positivas para alguna de las AFs. 71 muestras de leche fueron positivas para AFM_1. La tabla 1 recoge el número de muestras positivas para cada toxina y el rango de concentraciones en el que se encontraron.

Toxina	Muestras positivas(% del total)	Rango (µg kg^{-1})
AFB_1	24 (12,4%)	0,14-4,66
AFB_2	9 (4,7%)	0,05-0,41
AFG_1	47 (24,4%)	0,13-6,45
AFG_2	13 (6,7%)	0,10-0,57
AFM_1 (24 h)	35 (19,0%)	0,009-1,36
AFM_1 (48 h)	36 (18,8%)	0,009-0,65

Tabla 1: Muestras positivas para cada toxina

Las toxinas más frecuentes fueron la AFB_1 y la AFG_1. En las muestras positivas para la AFB_1, siempre se encontraron concentraciones por debajo del límite establecido de 5,0 µg/kg. Solo se encontró una muestra con una concentración de AFG_1 por encima del límite legal (6,45 µg/kg). Tres muestras de leche presentaron concentraciones de AFM_1 por encima del límite de la UE de 0,05 µg/ kg.

En cuanto a la influencia de la composición de la ración *unifeed* en la presencia de AFs, se vio que las muestras positivas para alguna de las AFs normalmente contenían ensilado de maíz, ensilado de centeno, ensilado de cebada, cebadilla, soja, heno de alfalfa, semilla de algodón, ray grass deshidratado, paja, cascarilla de soja y okara (Figura 1). El pienso compuesto parecía influir en la presencia de AFs del grupo B. Las muestras positivas para AFB_1 presentaban normalmente soja, maíz, cebada, ensilado de cebada y heno de alfalfa, además de maíz, semilla de algodón y trigo procedentes del pienso compuesto (Figura 2).

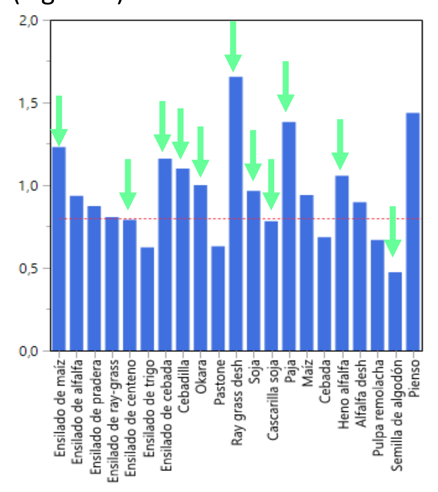


Figura 1: Componentes de las muestras de la ración *unifeed* relacionados con la presencia de AFs totales. Los ingredientes correlacionados positivamente con la presencia de AFs aparecen señalados con una flecha verde.

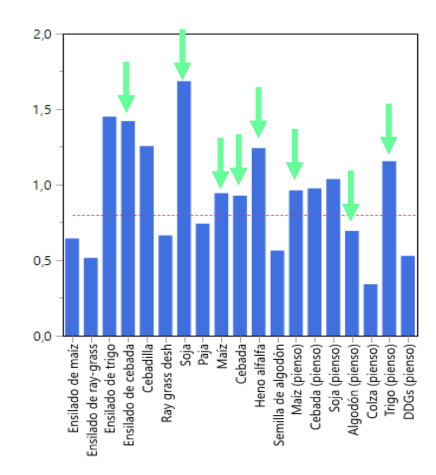


Figura 2: Componentes de las muestras de ración *unifeed* relacionados con la presencia de AFB_1. El pienso compuesto aparece desglosado en sus componentes. Los ingredientes correlacionados positivamente con la presencia de AFB_1 aparecen señalados con una flecha verde.

15 muestras de leche positivas para AFM_1 procedían de vacas alimentadas con *unifeed* positivo para AFB_1. Se estableció que la tasa de transferencia AFB_1/AFM_1 de la ración *unifeed* a la leche variaba del 0-6%.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Gobierno de España la financiación económica (MINECO, Proyecto AGL2014-55379-P). M. Rodríguez-Blanco agradece a la Universitat de Lleida su beca predoctoral.

REFERENCIAS

[1] International Agency for Research on Cancer (IARC). **2002**. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 82. Lyon (France): IARC Press; p. 171-300.

[2] European Commission. **2002**. Directive 2002/32/EC of the European Parliament of the Council of 7 May 2002 on the undesirable substances in animal feed. *Off. J. Eur. Union*. L140:10-21.

[3] J. Fink-Gremmels, *Food Addit. Contam.*, **2008**, *25*, 172-180.

PRODUCCIÓN DE GABA POR BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS DE ORIGEN LÁCTEO E INTESTINAL

Valenzuela J.A.[1,2], Flórez A.B.[1], Vasek O.M.[2], Mayo B.[1]
1 Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, IPLA-CSIC, Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, España
2 Biotecnología Microbiana para la Innovación Alimentaria, Instituto de Modelado e Innovación Tecnológica-Universidad Nacional del Nordeste (CONICET-UNNE), Campus UNNE, Corrientes-3400, Argentina
baltasar.mayo@ipla.csic.es

Introducción

El ácido γ-aminobutírico (GABA) resulta de la descarboxilación del ácido glutámico por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD). La ingesta de GABA reduce la presión arterial, reduce el estrés psicológico y modula la función renal. En la actualidad, no hay disponibles fermentos comerciales de cepas productoras, lo que abre oportunidades para seleccionar bacterias ácido-lácticas (BAL) productoras para su utilización en la industria. Estas cepas podrían emplearse en el desarrollo de productos lácteos enriquecidos que promuevan la salud.

Material y Métodos

Producción de GABA

El análisis de gran número de cepas requiere un método sensible y rápido. El cribado que empleamos en este trabajo se basó en el descrito por Tsukatani et. al. [1]. En este método la detección y cuantificación de GABA se realiza mediante el seguimiento de la formación de NADPH a 340 nm. El NADPH se forma a partir de GABA y α-cetoglutarato en presencia de $NADP^+$ y la enzima GABasa (Sigma-Aldrich), mezcla de GABA-T (γ-aminobutirato glutamato aminotransfera-sa) y SSDH (succinato semialdehido dehidrogenasa).

Determinación de la curva de calibrado

Se prepararon concentraciones variables de GABA (Sigma-Aldrich) en medio de cultivo y se sometieron a las mismas condiciones de incubación que las muestras.

Detección del gen GAD

El ADN total de las cepas se extrajo y se purificó mediante la utilización del kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA (Sigma Aldrich). La presencia del gen GAD se determinó mediante PCR utilizando cebadores específicos para los genes de *Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus thermophilus*.

Los amplicones se purificaron por medio del kit comercial Gen Elute PCR clean-up (Sigma Aldrich) y se secuenciaron. Las secuencias se compararon con las de las bases de datos mediante BLAST.

Resultados y Discusión

Las curvas de calibrado se utilizaron para estimar la cantidad de GABA producido por cada una de las cepas bacterianas en estudio. En la Figura 1 se puede ver la curva de calibrado de GABA en el medio MRS. Como puede verse, bajo las condiciones y concentraciones de ensayo, hubo una muy buena linearidad entre la absorbancia y la cantidad de GABA. Con un resultado muy similar, se realizó también una curva de calibrado en el medio M17.

Analizamos la producción de GABA en una colección de bacterias ácido-lácticas (BAL)

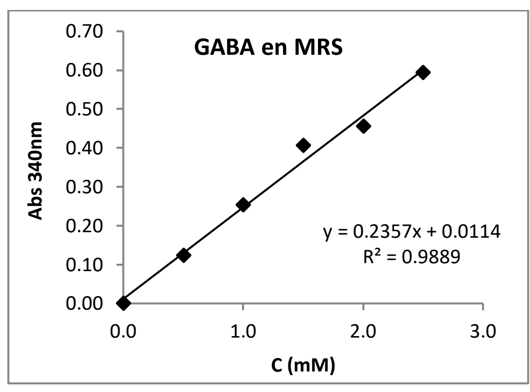


Figura 1: Absorbancia versus concentración de GABA en medio de cultivo.

y bifidobacterias de origen lácteo e intestinal. En total, se analizaron 265 cepas pertenecientes a los géneros *Lactococcus* (153)*, Lactobacillus* (54)*, Streptococcus* (39), *Leuconostoc* (14)*, Bifidobacterium* (3), y otros (2). En particular, se analizaron numerosas cepas de las especies *Lactococcus lactis* (153) y *Streptococcus thermophilus* (39); sin duda las especies de mayor interés tecnológico para la formulación de fermentos industriales.

Tal como han reportado numerosos autores [2, 3], la producción de GABA, fue variable entre especies y cepas (Figura 2). La producción de GABA se situó entre las que no producían nada y los 2,4 mM. Se han identificado numerosas cepas capaces de producir más de 1 mM de GABA.

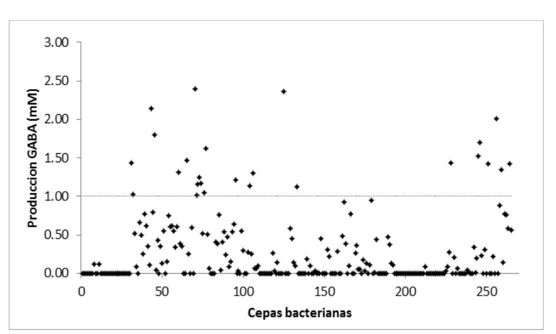


Figura 2: Producción de GABA por cepas de BAL y bifidobacterias de este estudio a partir de su precursor (glutamato monosódico 1% p/v).

La presencia del gen GAD se determinó mediante reacciones de amplificación utilizando oligonucleótidos específicos, tal como se muestra en la Figura 3 para tres cepas de *S. thermophilus*. El gen se detectó en todas las cepas productoras excepto en una cepa de *Lc. lactis* (L43).

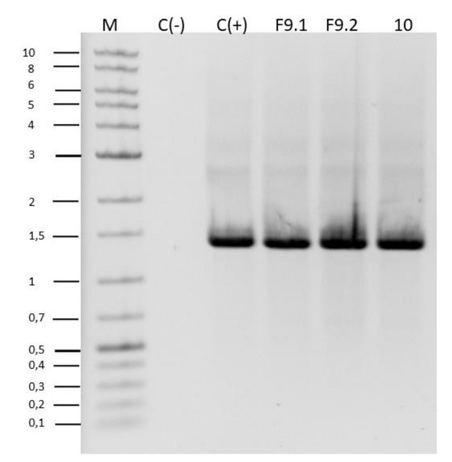


Figura 3: Detección del gen GAD en tres cepas de *S. thermophilus*. C(-) y C(+) controles.

El análisis de la secuencia de algunos genes mostró una identidad casi total con las de cepas de referencia de cada especie.

Como conclusión podemos decir que (i) se ha ensayado la capacidad de producción de GABA a partir de glutamato de sodio en una colección de BAL, (ii) unas 25 cepas producen cantidades de GABA mayores de 1 mM y (iii) la producción de GABA se está cuantificando mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (UHPLC).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo mediante el apoyo de un Proyecto del Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación del Principado de Asturias (Ref. GRUPIN14-137).

REFERENCIAS

[1] Tsukatani T, Higuchi T, Matsumoto K. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, *540*, 293-297.

[2] Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello CG, Coda R, Gobbetti, M. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, *73*, 7283-7290.

[3] Franciosi E, Carafa I, Nardin T, Schiavon S, Poznanski E, Cavazza A, Larcher R, Tuohy KM. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 625740.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LECHE PASTEURIZADA DISTRIBUIDA EN LA CIUDAD DE TIJUANA, BAJA CALIFORNIA

Vázquez E., Pérez E., Alcántara L., Hurtado L.
Universidad Autónoma de Baja California/Facultad de Ciencias Químicas/Laboratorio de Análisis Microbiológico/ Calzada Universidad #14418, Parque Industrial Internacional Tijuana, B.C., C.P. 22427
lilyhurtado@uabc.edu.mx

La leche funciona exclusivamente como fuente de alimento, y debido a esto es aceptada universalmente por su alto valor nutrimental, ya que a su vez contiene diferentes sustancias que actúan como parte fundamental de los sistemas inmunológicos y de protección de un recién nacido [1].

La leche tiene el riesgo de contaminarse desde su síntesis en la glándula mamaria hasta la llegada al consumidor. Estos riesgos son, la contaminación por microorganismos, alteración físico-química, absorción de olores extraños, y contaminación por sustancias químicas, etcétera. Todos los riesgos, ya sea en forma aislada o en conjunto, contribuyen en forma negativa sobre la calidad higiénica y nutricional del producto y, consecuentemente, afectan la salud pública y la economía de cualquier país [2].

El contenido de microorganismos presentes en la leche depende principalmente de la limpieza de las máquinas, utensilios de ordeño y las prácticas de ordeño utilizadas [3].

Los principales microorganismos que provocan enfermedades relacionadas con los lácteos son: *Salmonella spp., L. monocytogenes, S. aureus* y *E. coli.* Los cuales provocan una serie de enfermedades en los humanos, aunque estos son inactivados con la pasteurización [4].

Por estos motivos el objetivo de esta investigación fue determinar la concentración microbiana en las diferentes marcas de leche pasteurizada de mayor consumo en la ciudad de Tijuana B.C., de acuerdo a la NOM-243-SSA1-2010, para establecer las especificaciones de calidad microbiológica en la distribución del perfil sanitario de las leches pasteurizadas.

Metodología

Se realizó un estudio experimental en las 9 delegaciones de la ciudad de Tijuana México, durante el periodo de mayo a septiembre de 2014. Las muestras que se incluyeron fueron de leche pasteurizada, las dos principales marcas y su presentación, analizándose un total de 72 muestras.

El análisis microbiológico de la leche se realizó con el método de Petrifilm 3M™, para este estudio se utilizaron placas para conteo de coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp. y Listeria monocytogenes*.

Resultados y Discusión

En la Tabla1 se muestran los resultados de los análisis realizados para cada bacteria respectivamente. Como se observa *Salmonella spp.* y *L. Monocytogenes* no aparecen, esto indica que estuvieron ausentes en todas las muestras analizadas.

Microorganismos	No contaminadas	Contaminadas	Muestras fuera de especificación
Coliformes totales	58	14	4
S. aureus	67	5	3

Tabla1: Resultados obtenidos en el análisis de 72 muestras.

De las 72 muestras 14 presentaron contaminación por coliformes totales, cuatro de ellas estuvieron fuera de especificación según la NOM-243-SSA1-2010 [5], la cual permite <20 UFC/mL, cinco muestras tuvieron presencia de *S. aureus* de las cuales tres salieron de los límites aceptables (<10 UFC/mL).

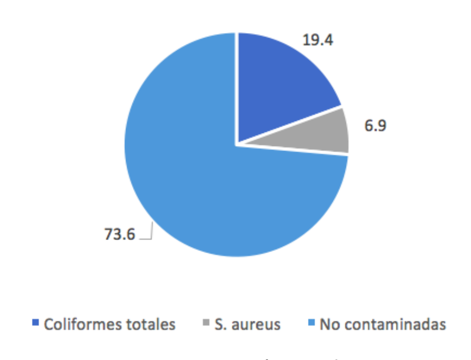


Figura 1: Comparación de muestras contaminadas por la presencia de Coliformes totales y *E. coli*

Luigi et al. [6], tuvieron un 45% de sus muestras contaminadas por coliformes totales, mientras que en el presente estudio sólo el 19.4%, en cuanto a la presencia de *Staphylococcus aureus*, se detectó en el 6.9% de las muestras, en la bibliografía analizada, los autores no realizaron esta prueba. Sin embargo es importante este análisis debido a que en nuestros resultados si se encontraron algunas muestras contaminadas con esta bacteria, lo que indica que la pasteurización no siempre es efectiva.

Conclusiones

La presencia de *Staphylococcus aureus* y Coliformes totales indica que la pasteurización no siempre es efectiva para eliminar estos microorganismos, convirtiéndose en un problema tanto local como a nivel mundial, por ser un alimento indispensable en el desarrollo de los infantes. La ausencia de *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* en el total de muestras indica una pasteurización efectiva para estos microorganismos altamente patógenos. Concluyendose que la leche pasteurizada de las principales marcas consumidas en la ciudad es de buena calidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California y al CONACYT por el apoyo recibido durante el desarrollo del proyecto, sin el cual no hubiera sido posible.

REFERENCIAS

[1] Badui SD, Química de los alimentos. 4ta edición. México, **2006**.

[2] Arrieta LEM. Evaluación microbiológica de la leche y los productos lácteos producidos en cuatro expendios de la zona metropolitana de Morelia. Tesis, 2011.

[3] Carrillo LB, González MM, Schobitz TR, Molina CLH, Brito CC. *Agro Sur*, **2004**, *32*(2):45-53.

[4] Pascual MRA. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª edición. Madrid, **2000**.

[5] Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

[6] Luigi T, Rojas L, Valbuena O. *Salus*. **2013,** *17*(1): 35-50.

SESIÓN 2A. FERMENTACIONES LÁCTICAS EN VEGETALES Y VINOS

BIOFILMS EN EL ENTORNO DE LA FERMENTACIÓN DE ACEITUNAS DE MESA

Calero Delgado Beatriz, Arroyo López Francisco Noé, Jiménez Díaz, Rufino
Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa (CSIC). Campus de la U.P.O., Edificio 46, Ctra. de Utrera km 1, 41013 Sevilla
rjimenez@cica.es

La producción de aceitunas de mesa, alimento de gran importancia socioeconómica para España y el resto de países de la cuenca mediterránea, donde secularmente se ha venido produciendo en sus múltiples variedades y formas de presentación, es una práctica basada, hasta hace muy poco tiempo, en procedimientos meramente tradicionales, empíricos. Ello contrasta con su enorme complejidad microbiológica dado que dicha fermentación se sustenta en las actividades metabólicas de un grupo de bacterias lácticas pertenecientes, principalmente, a la especie *Lactobacillus pentosus* y a una gran variedad de especies de levaduras. Esta complejidad ha despertado recientemente el interés científico por este ecosistema único, por lo que varios grupos de investigación, principalmente españoles, italianos y griegos han volcado sus esfuerzos en comprender no solo cómo mejorar el proceso fermentativo a través de la utilización de cultivos iniciadores y la modificación de diversos parámetros fisico-químicos, sino en dilucidar y entender las interacciones entre los microorganismos que intervienen directamente en dicho proceso. En suma, estudiar la ecología microbiana de esta fermentación peculiar.

Las bacterias son organismos gregarios que se encuentra normalmente formando parte de comunidades microbianas densamente pobladas, conocidas como biofilms. Estos colectivos microbianos que aparecen embebidos en polímeros que ellos mismos secretan, ocupan una gran variedad de superficies bióticas y abióticas.

La ubicuidad de los biofilms en ambientes naturales, entre los que se incluyen hospedadores animales y vegetales, sugiere que la vida en grupo es esencial para la ecología y la evolución de estos microorganismos.

Es de sobra conocido que los biofilms monoespecie son muy raros en la naturaleza, mientras que los formados por diferentes especies de bacterias y por Eucariotas (principalmente levaduras) son mucho más frecuentes. Este es el caso de los biofilms que se desarrollan en el entorno de la fermentación de aceitunas de mesa.

A través de diversas, pero escasas aún, publicaciones, se ha podido constatar que *L. pentosus* y levaduras se asocian formando comunidades polimicrobianas no sólo en las superficies sólidas del entorno de la fermentación (paredes de los fermentadores, tuberías, etc.), sino en la piel de los frutos, donde forman verdaderos biofilms. En ellos, bacterias y levaduras se encuentran embebidos en una matriz polimérica compuesta principalmente por EPS, ADN extracelular y proteínas. Cualquiera sea la variedad de aceituna empleada, el cultivo iniciador o los microorganismos espontáneos que se desarrollen en la fermentación, la presencia de biofilms en la superficie de los frutos es un hecho contrastado.

Se han realizado estudios *in vitro* acerca de la capacidad de formación de biofilms por diversas cepas de *L. pentosus* y se ha podido constatar que existen diferencias

notables entre ellas, desde las que forman biofilms consistentes hasta aquellas que no lo forman en absoluto. Variables tales como la temperatura de incubación, el acondicionamiento (biológico o físico) y la naturaleza de la superficie a colonizar, la presencia de bacteriocinas, etc. condicionan la formación de biofilms por *L. pentosus*. Por último, los genes relacionados con la formación de biofilms descritos en otras bacterias lácticas están también presentes en el genoma de las cepas de *L. pentosus* aisladas de fermentaciones de aceitunas.

Por otro lado, cuando se realizan experimentos de coagregación de cepas de *L. pentosus* con diversas especies de levaduras aisladas de fermentaciones de aceitunas se puedo constatar que dichos biofilms son más fuertes cuando se utilizan determinados pares lactobacilos-levaduras. No obstante, la adición al medio de ensayo de compuestos fenólicos que se encuentran naturalmente en la aceituna (hidroxitirosol, hidroxitirosol-OH, tirosol y oleuropeína) provoca un aumento considerable de la actividad formadora de biofilms en aquellos pares que no lo formaban anteriormente. Los mecanismos de formación de estos pares microbianos pueden ser diversos pero estudios recientes apuntan a que, al menos en algunos casos, los lactobacilos podrían interaccionar con las levaduras a través de receptores de manosa. La obtención de mutantes espontáneos no coagregantes de algunas cepas de *L. pentosus* así lo sugieren. No obstante, en cocultivos donde bacterias y levaduras están separadas físicamente por una membrana, se puede observar cómo las levaduras forman biofilms, lo que se debería a una señal producida por *L. pentosus*, aunque esta hipótesis está actualmente en estudio.

La formación de biofilms en una gran variedad de bacterias se ha atribuido en muchos casos a la producción de autoinductor tipo AI-2, también denominado comunicador universal, ya que lo producen y responden a él tanto bacterias Gram + como Gram -. AI-2 es una molécula producida por ciclación espontánea de otra denominada DPD, que se produce por hidrólisis de la S-ribosil homocisteína. Las proteínas denominadas Pfs y LuxS, que intervienen secuencialmente en la hidrólisis de la S-adenosil homocisteína y la S-ribosil homocisteína, respectivamente, son las responsables de la síntesis de AI-2. Los genes que codifican ambas proteínas, *pfs* y *luxS*, están presentes en el genoma de todas las cepas de *L. pentosus* aisladas de fermentaciones de aceitunas. Estudios *in vitro* demuestran que todas estas cepas son capaces de producir AI-2 en medio sintético. Ambos genes se han clonado en un vector de expresión y se ha podido comprobar que las proteínas correspondientes tienen actividad biológica *in vitro*, ya que son capaces de transformar sus respectivos sustratos, produciendo AI-2. Que AI-2 esté implicado o no en la formación de biofilms en estas cepas de lactobacilos está aún por dilucidar. No obstante, se ha podido comprobar la presencia de AI-2 en salmueras de fermentación y biofilms en la superficie de los frutos durante el proceso fermentativo, así como en muchas otras situaciones, tanto *in vivo* como *in vitro*.

En el transcurso de la presentación se mostrará un amplio abanico de resultados que indican el papel de los biofilms mixtos *L. pentosus*-levaduras en la obtención de un producto final seguro y aceptable desde el punto de vista sensorial, propiedades que hacen de la aceituna de mesa un alimento muy apreciado por los consumidores.

AGRADECIMIENTOS

Estos trabajos han sido financiados por: MINECO (Proyecto AGL2013-48300-R/ALI) y Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia AGR-7051). Beatriz Calero Delgado es Personal Investigador en Formación de la Junta de Andalucía.

LA ESTRATEGIA DE INOCULACIÓN DE NO-*SACCHAROMYCES* EN VINIFICACIÓN AFECTA A *OENOCOCCUS OENI* Y A LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

Martín A., Balmaseda A., Bordons A., Reguant C.
Universitat Rovira i Virgili, Facultat d'Enologia, Dpto. de Bioquímica i Biotecnologia, Grupo de Biotecnología Enológica, línea de Bacterias Lácticas. C/ Marcel·li Domingo, 1. Tarragona.
aitor.balmaseda@urv.cat

La fermentación maloláctica (FML) del vino consiste en la descarboxilación del ácido L-málico en ácido L-láctico por parte de las bacterias lácticas [1]. Particularmente, la especie que domina este proceso es *Oenococcus oeni* y suele ser la candidata a utilizar como cultivo iniciador. Esta FML está altamente influenciada por las propiedades fisicoquímicas intrínsecas del vino, especialmente modificadas por el metabolismo de las levaduras que desarrollan la fermentación alcohólica (FA).

El uso de las no-*Saccharomyces* está en auge debido a las actividades enzimáticas características de estas levaduras que mejorarían el perfil organoléptico del vino final [2]. Estas levaduras son inoculadas al inicio de la FA del mosto. Debido a la incapacidad de terminar la FA de muchas no-*Saccharomyces*, se requiere de la inoculación de *S. cerevisiae* para terminar el proceso, diferenciando así dos estrategias de inoculación: coinoculada y secuencial. Así, la FML se puede ver afectada por los cambios en la composición del vino por la inoculación de levaduras no-*Saccharomyces* [3]. Los compuestos que median las interacciones levadura - *O. oeni* serán mayoritariamente los mismos que en una fermentación de *S. cerevisiae,* si bien la concentración de los mismos será diferente según el metabolismo de la no-*Saccharomyces* utilizada. En este nuevo escenario, los tiempos de inoculación de *S. cerevisiae* parecen determinantes en la composición química del vino.

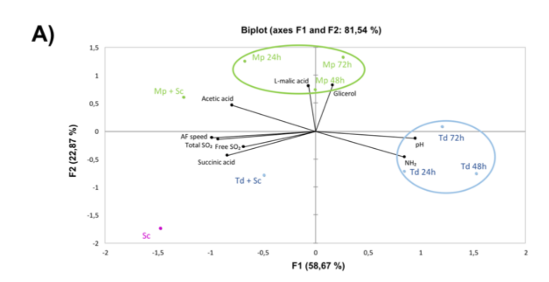
El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del uso de levaduras no-*Saccharomyces* sobre el desarrollo de la FML con diferentes tiempos de inoculación de *S. cerevisiae*.

Para ello, se realizaron fermentaciones alcohólicas coinoculadas y secuenciales (inoculando *S. cerevisiae* 24, 48 y 72 horas después de la no-*Saccharomyces*) con las levaduras *Torulaspora delbrueckki* Biodiva, *Metschikowia pulcherrima* Flavia y *S. cerevisiae* Lalvin-QA23 (Lallemand Inc.). Posteriormente, los vinos resultantes se inocularon con *O. oeni* PSU-1 (ATCC BAA-331) para el desarrollo de la FML.

Durante la FA, los vinos inoculados inicialmente con no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* y los obtenidos por FA secuencial fueron distintos (Figura 1A). Cabe destacar que en las fermentaciones secuenciales de *M. pulcherrima* no se consumieron apenas azúcares hasta que se inoculó *S. cerevisiae*. También, las fermentaciones secuenciales de *T. delbrueckii* duraron más tiempo cuanto más se esperó en inocular *S. cerevisiae*. En cuanto al grado alcohólico, no hubo diferencias entre los diferentes vinos, y su contenido no disminuyó con el uso de estas levaduras no-*Saccharomyces*.

En cambio, en la FML (Figura 1B), las fermentaciones secuenciales de *T. delbrueckii* duraron menos tiempo cuando la inoculación de *S. cerevisiae* fue más tardía. Aun así, no llegaron a superar la

velocidad de las fermentaciones control con *S. cerevisiae*.



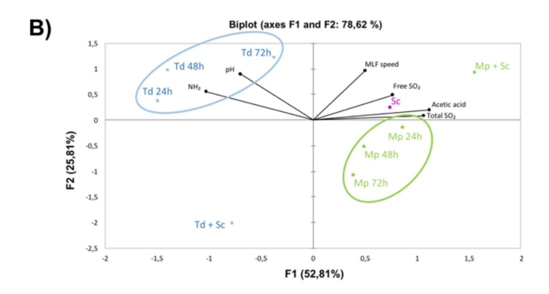


Figura 1: Análisis de componentes principales de los vinos obtenidos según las variables con diferencias significativas. **A)** vinos después de FA, **B)** vinos después de FML.

Los vinos fermentados secuencialmente con *T. delbrueckii* tuvieron un pH más elevado, tanto al final de la FA como de la FML (Figura 1B). También es necesario señalar que las fermentaciones secuenciales de *T. delbrueckii* produjeron menos ácido acético que *S. cerevisiae*, mientras que *M. pulcherrima* superó dicha producción respecto al control. Por otro lado, las fermentaciones con *M. pulcherrima* aumentaron la concentración de glicerol con el tiempo de inoculación de *S. cerevisiae*.

Otro aspecto a destacar es el consumo de ácido L-málico durante la FA. Todas las levaduras consumieron cantidades similares, exceptuando las fermentaciones secuenciales de 72h con *T. delbrueckii*, y co-inoculada y 24h con *M. pulcherrima*, en las que el consumo fue menor. Respecto al ácido succínico, ambas levaduras no-*Saccharomyces* redujeron su contenido cuando se inoculó *S. cerevisiae* más tarde. De la misma manera, las fermentaciones secuenciales tuvieron menor producción de SO_2, destacando las de *T. delbrueckii*.

Por lo tanto, se puede concluir que el uso de levaduras no-*Saccharomyces* tiene un impacto en la composición química de los vinos. Además, en esta composición se refleja la naturaleza de la inoculación, diferenciando los vinos inoculados de manera conjunta o secuencialmente con *S. cerevisiae.* En este sentido, parece que los tiempos de inoculación de *S. cerevisiae* no tienen gran impacto en el vino obtenido. Aunque los vinos fermentados con *T. delbrueckii* deberían tener un efecto positivo (pH más bajo, mayor concentración de ácido succínico y SO_2) sobre *O. oeni* y la FML, dichas fermentaciones han sido más lentas que el control. Esto podría deberse al aumento de algunos compuestos inhibidores no estudiados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2015-70378-R del Ministerio de Economía y Competitividad. Balmaseda agradece su contrato predoctoral a la Generalitat de Catalunya.

REFERENCIAS

[1] S.Q. Liu, *J. Appl. Microbiol.*, **2002**, *92*, 589-601

[2] N.P. Jolly, O.P.H. Augustyn and I.S. Pretorius, *S-Afr. J. Enol. Vitic.*, **2006**, *1*, 15-39.

[3] A. Balmaseda, A. Bordons, C. Reguant and J. Bautista-Gallego, *Front. Microbiol.*, **2018**, *9*: 534.

ASSESSMENT OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF BACTERIAL SPECIES ISOLATED FROM TABLE OLIVE; *LACTOBACILLUS PENTOSUS* VS *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Benítez-Cabello A.[1,2], Rodríguez-Gómez F.[1,] Torres-Maravilla E.[2], Bermúdez-Humarán L.G.[2], Langella P.[2], Calero-Delgado B.[1], Romero-Gil V.[1], Bautista-Gallego J.[1], Jiménez Díaz R.[1], Arroyo-López F.N.[1]

1 Food Biotechnology department. Instituto de la Grasa (Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC). Universitary Campus Pablo de Olavide, Building 46, Ctra. Utrera, km 1, 41013- Sevilla, Spain.

2 INRA, Commensal and Probiotics-Host Interactions Laboratory, UMR 1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, Francia.

abenitez@ig.csic.es

Lactobacillus pentosus and *Lactobacillus plantarum* are the main species in the fermentative process of table olive.

The probiotic potential of these species has been studied on numerous occasions in fermented food. Nevertheless, there is few information of this potential for the strains present in the table olives processing. The aim of this work was the determination of the probiotic potential of different strains of *L. pentosus* and *L. plantarum* species isolated from the surface of different varieties of table olives and elaborations.

Four strains belonging to *L. pentosus (L9 and L13)* y *L. plantarum* (L15 and L16) species were used for this purpose. The presence of BSH genes, hypocholesterolemic activity in vitro [1], inhibition of pathogens, production of enzymes of biological interest [2], capacity of self and coaggregation with yeasts, gastrointestinal resistance and immunomodulatory activity in different murine and human cell lines were determined [3].

The bacterial strain with the best anti-inflammatory properties was selected and tested in vivo in a murine model with chronic colitis induced by dinitro-benzene sulfonic acid (DNBS). Weight loss, significant differences in intestinal permeability and cytokine modulation as inflammation reading were quantified.

All the *L. pentosus* and *L. plantarum* strains could inhibite the growth of *Escherichia coli* 4782 and *Listeria monocytogenes* in vitro, being this effect higher in the case for *E.coli.*

On the other hand, only the *L. plantarum* strains showed the presence of BsH1 gen which might be related to a higher resistance to pancreatic digestion and cholesterol assimilation found for these strains compared with the *L.pentosus* strains values (Fig. 1). BsH 2 gen was only detected in *L. pensosus* L13.

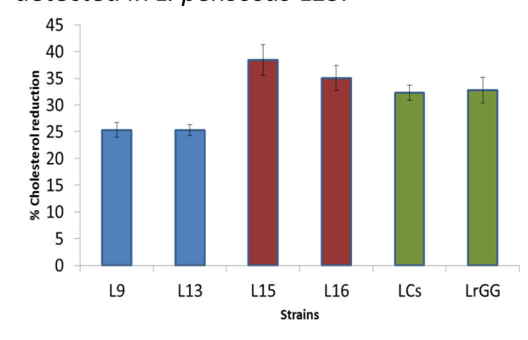


Figura 1: Percentage of cholesterol reduction of the strains studied in MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) supplemented with Oxgall and cholesterol. Results were compared with the commercial probiotics strains *L. casei* Shirota and *L. rhamnosus* GG.

If we attend to the production of enzymes of biological intererest, an high β-

galactosidase and sterase activity was dectected in *L. pentosus* L9 and L13, which was no observed in the case of none of the *L. plantarum* strains. (Table 1).
Moreover, while both L9 and L13 showed a high aggregation capacity, this was very low in the *L. plantarum* strains.

STRAINS	B-Galactosidase	Phytase
L9	314,28	54246,34
L13	140,64	81739,88
L15	0,00	4434,58
L16	12,36	1122,13

Table 1: β-galactosidase and Phytase activities of *L.pentosus* and *L.plantarum* strains. Results are expressed as enzymatic units (U).

In terms of the immunomodulatory capacity of the strains, since IL-8 is considered as a major inflammatory mediator (pro-inflammatory cytokine), bacteria enhancing its secretion are usually considered as pro-inflammatory, while those inhibiting its secretion as anti-inflammatory. We thus investigated whether LAB strains isolated from olives had the ability to suppress IL-8 secretion by HT-29 cells stimulated with TNF-α. We also studied the strains capacity to regulate the production of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and the anti-inflammatory IL-10. In this case, we observed a complete regulation of both cytokines, promoting the release of IL-6 and at the same time, regulating its activity by promoting the release of IL-10 by RAW 264.7 cell line.
All the strains could decrease the IL-8 secretion by HT-29. While *L. pentosus* L9 and L13 strains decreased 56 and 41 % of secretion respectively, *L. plantarum* L15 and L16 showed a 44 and 24 % reduction respectively.

On the basis of the in vitro results described above, we selected *L. pentosus* L9 to evaluate his protective effects in a murine colitis model induced by the DNBS.
DNBS administration severely affected mouse weight, resulting in an average weight loss of about 4% at the end of the experiment, in contrast to a gain of 5% in control mice without DNBS (PBS control group). Interestingly, although no significant differences were observed in macroscopic scores (data not shown), the administration of *L. pentosus* L9 limited weight loss and even resulted in a slight weight gain.
Mice treated with DNBS showed a higher permeability than control mice ($P<0.05$), confirming an alteration in the barrier function in terms of permeability. Administration of *L. plantarum* L9, decreased significantly ($P<0.05$) intestinal permeability with respect to DNBS control mice. We analyzed splenocyte cytokine production of IL-4, IL-5, IL-10, IL-17A, IL-22, IFN-γ, and TGF-β by ELISA. The administration of the three lactobacilli strains showed a clear tendency to inhibit the secretion of these cytokines.

In conclusion, while *L. plantarum* strains show an important role in chlolesterol assimilation, probably due in part to the presence of BSH1 gene, the results evidence a broad range of antiinflamatory effects in the case of *L.pentosus* strains, specially the strain L9. Moreover it is well known the role of β-galactosidase and phytase enzymes, found in *L.pentosus* strains, in the regulation of digestive processes. These results provide further evidence of the potential probiotic of *L. plantarum* and *L. pentosus* species isolated from table olives.

ACNOWLEDGMENT
The research has received funding from the Spanish Government (Project OliFilm AGL-2013-48300-R: www.olifilm.science.com.es). AB-C wish to express thanks to Commensal and Probiotics-Host Interactions *team, from Micalis Institute for their unconditional help in the development of part of this work.*

REFERENCES

[1] KOURELIS, Andreas, et al. *J. Biolog. Res.*, **2010**, *13*, 93.
[2] BONATSOU, S., et al. *Food Microbiol.*, **2015**, *46*, 66-73.
[3] TORRES-MARAVILLA, Edgar, et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, *100*, 385-396.

DETECCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS Y SU RELACIÓN CON LA MICROBIOTA INDÍGENA EN VINOS DE LA RIOJA ALAVESA

Díez-Ozaeta, I. [1]; Amárita, F. [1]; Pérez-Elortondo, F. J. [2, 3]; S. Rainieri[1]
[1] AZTI-Tecnalia, Investigación Alimentaria, Derio, España
[2] LASEHU, [3]Lactiker (Universidad del País Vasco-UPV/EHU). Vitoria-Gasteiz, España
idiez@azti.es

El objetivo del estudio fue identificar bacterias lácticas (BL) indígenas no productoras de aminas biógenas (AB) con potencial capacidad para su utilización como cultivos iniciadores. La principal especie aislada fue *Oenococcus oeni*, presentando además una gran riqueza genotípica. Se identificaron especies de *Staphylococcus* y *Paenibacillus* con gran capacidad de producción de aminas biógenas (AB), al contrario que las bacterias lácticas (BL) aisladas. Así mismo, estas especies como un alto porcentaje de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus hilgardii* fueron capaces de degradar la arginina, resaltando el potencial riesgo sobre la producción de precursores de carbamato de etilo (CE). Estos posibles efectos adversos sobre el vino se podrían disminuir mediante el uso de cultivos malolácticos con características seleccionadas.

INTRODUCCIÓN

Las principales aminas biógenas presentes en el vino son la histamina, putrescina, tiramina y cadaverina [1]. Su presencia deriva mayormente de la actividad descarboxilasa de las bacterias lácticas (BL) durante todo el proceso de vinificación, aunque el mayor aumento de estos compuestos ocurre durante y tras la fermentación maloláctica (FML). Así, una posible estrategia para minimizar o prevenir su formación es la inoculación de iniciadores malolácticos seguros incapaces de producirlas [2].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 33 muestras de caldos de fermentación en todas las etapas del proceso de vinificación procedentes de dos bodegas de la Rioja Alavesa.

Condiciones de cultivo y caracterización. Los aislamientos se realizaron en MRS, MRS suplementado con zumo de manzana y M17. La caracterización de los aislamientos comprendió su morfología, actividades oxidasa y catalasa y caracterización Gram.

Identificación y tipificación de los aislamientos. La identificación se llevó a cabo por secuenciación de la región ADNr 16 S previamente amplificada. Para la tipificación se empleó la técnica RAPD-PCR mediante el primer M13.

Producción de AB y degradación de arginina. La producción de AB y degradación de arginina se analizó en medio descarboxilasa suplementado con el correspondiente aminoácido precursor [3]. Los resultados se confirmaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), y la producción de amonio como indicador de la degradación de la arginina se cuantificó por el kit *Megazyme K-AMIAR.*

Cuantificación de AB en muestras de mosto y vino. La cuantificación de AB en las muestras de mosto y vino se realizó por RP-HPLC

RESULTADOS

Oenococcus oeni resultó la especie más abundante (**Tabla 1**), siendo prácticamente la única especie aislada al final de la FML (>98%). La distribución de BL más diversa se encontró en los mostos donde aparte de

O. oeni también se encontraron *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus plantarum* y *Pediococcus parvulus.* Además, se identificaron especies de *Staphyloccoccus* y *Paenibacillus* raramente encontradas durante el proceso de vinificación [4], pudiéndose tratar de potenciales bacterias involucradas en el deterioro del vino.
Aunque la diversidad microbiana estuvo determinada por la predominancia de *O. oeni*, esta especie mostró una diversidad genotípica creciente a lo largo del proceso de vinificación (**Tabla 2**).

Tabla 1. Porcentaje de especies identificadas en las diferentes etapas de vinificación.

Etapa	1	2	3
O. oeni	15	68	99
L. hilgardii	-	15	1
L. mali	50	-	-
P. parvulus	7	1	-
L. plantarum	7	-	-
S. warneri	-	6	-
S. epidermidis	21	3	-
P. polymyxa	-	6	-
P. taichungensis	-	1	-

1: mosto; 2: FML intermedia; 3: FML final

Tabla 2. Nº de aislamientos y genotipos de *O. oeni* y su índice de diversidad durante la vinificación

Etapa	1	2	3
Nº total de aislamientos	13	118	143
Nº aislamientos *O. oeni*	2	76	142
Nº genotipos *O. oeni*	1	8	14
ID*	-	0.78	0.83

1: mosto; 2: FML intermedia; 3: FML final

Tras analizar la capacidad de los aislamientos para producir AB y degradar la arginina, ninguna de las cepas de BL fue capaz de producir ninguna de las AB estudiadas. Por el contrario, las especies de *Staphylococcus* y *Paenibacillus* destacaron por su gran capacidad aminobiogénica. Respecto a la degradación de arginina, un alto porcentaje de *O. oeni* (40%) y *L. hilgardii* (70%), así como de *Staphylococcus* y *Paenibacillus* fueron capaces de consumirla.

Finalmente, se analizó la concentración de AB de las 33 muestras en todas las etapas de vinificación y de las cuales se habían realizado los aislamientos. Desde el mosto se detectó la presencia de putrescina y cadaverina, y es que estas poliaminas se presentan de manera natural en la planta y la uva como mediadores en el crecimiento y maduración del fruto. La putrescina sufrió un ligero aumento a lo largo del proceso; sin embargo, la cadaverina redujo su concentración, posiblemente tras una coprecipitación con las lías. Respecto a la histamina y tiramina, éstas sufrieron un aumento significativo ($p<0,05$) durante todo el proceso.

CONCLUSIONES

Los resultados confirmaron la gran adaptación de *O. oeni* a las estrictas condiciones del vino, así como la riqueza genotípica de esta especie durante la FML. La capacidad de las BL para producir AB fue prácticamente inexistente; sin embargo, hay que destacar la presencia de especies de *Staphylococcus* y *Paenibacillus* que presentaron gran actividad amino-biogénica, siendo un potencial riesgo en el deterioro de los vinos. También cabe señalar el alto índice de microorganismos degradantes de arginina y potenciales productores de precursores de CE, siendo los cultivos iniciadores una posible estrategia para minimizar este problema.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Moreno-Arribas, M.; Polo, M.; Jorganes, F.; Muñoz, R., *Int. J. Food Microbiol.,* **2003**, *84*, 117-123.

[2] Sumby, K.M.; Grbin, P.R.; Jiranek, V., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2014**, *98*, 8111-32.

[3] Bover-Cid, S.; Holzapfel, W.H., *Int. J. Food Microbiol.*, **1999**, *53*, 33-41.

[4] Nicolas, H.; Watson, B.A.; Fellman J.K., Mattinson, D.S., Charles G.E.., *Food Microbiol.*, **2010**, *137*, 230-235.

EFECTOS DEL USO DE NO-*SACCHAROMYCES* SOBRE *OENOCOCCUS OENI* Y LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA DEL VINO

Ferrando N.[1], Araque I.[1], Ortís A.[1], Thornes G.[1], Bautista-Gallego J.[2], Bordons A.[1], Reguant C.[1]

1 Universitat Rovira i Virgili, Facultad de Enologia, Departamento de Bioquímica i Biotecnología, Grupo de Biotecnología Enológica. c/ M. Domingo, 1, 43007 Tarragona, Cataluña, España

2 Universidad Campus Pablo de Olavide, Instituto de la Grasa-CSIC, Departamento Biotecnología de Alimentos. Ctra. Utrera, km 1, 41013 Sevilla, España

nuria.ferrando@urv.cat

INTRODUCCIÓN

En la actualidad hay un creciente interés por el uso de levaduras no –*Saccharomyces* por parte del sector enológico. Se ha descrito que algunas de estas levaduras son capaces de modificar la composición del vino.[1] A pesar de ello, apenas existen estudios científicos publicados sobre el posible efecto del uso de no-*Saccharomyces* sobre la fermentación maloláctica (FML) y el crecimiento de *Oenococus oeni,* especie predominante en esta segunda fermentación.

Por este motivo, los objetivos de este trabajo es evaluar el efecto del uso de levaduras no-*Saccharomyces* sobre la cinética de la fermentación alcohólica (FAL) y la FML, y caracterizar los factores más relevantes en la interacción entre No-*Saccharomyces* y *O. oeni*.

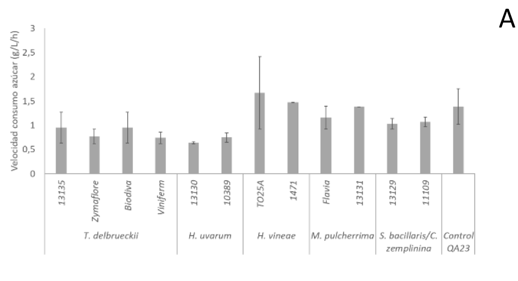
MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de no-*Saccharomyces* utilizadas para las FAL fueron 13130 y CECT 10389 de *Hanseniaspora uvarum,* T02/5AF y CECT 1471 de *Hanseniaspora vineae*, 13135, NSA-1 Viniferm NSTD, Biodiva TD291 y Zymaflore Alpha de *Torulaspora delbrueckii*, 13129 y 11109 de *Starmerella bacillaris,* Flavia MP346 y CECT 13131 de *Metschnikowia pulcherrima*. La cepa de *S. cerevisiae* utilizada tanto para las fermentaciones secuenciales como para la fermentación control fue la Lalvin-QA23. En relación con las cepas de *O. oeni* para las posteriores FML, se utilizaron 1Pw13, VP41, CH11 y PSU-1. Se realizaron fermentaciones secuenciales por duplicado en 400 mL de mosto diluido a 200 g/L de azúcar y 300 mg/L de YAN. Se inoculó una población de 10^6 UFC/mL de no-*Saccharomyces* y pasadas 24h se inoculó la misma población de *S. cerevisiae*. Los vinos resultantes de dividieron en cuatro alícuotas de 50 mL y cada una de ellas se inoculó con una cepa distinta de *O. oeni* a una población de 10^7 UFC/mL. Las fermentaciones se controlaron cada 24h determinando el consumo de azúcar o de ácido L-málico y las poblaciones de microorganismos. Tanto al final de FAL como de FML se realizó un análisis de los metabolitos que podían tener un impacto en la FML y *O. oeni.*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con excepción de las FAL donde intervino las cepas de *H. vineae y M. pulcherrima* las fermentaciones secuenciales presentaron, en general, velocidades de fermentación más bajas que la fermentación control con únicamente QA23 (Figura 1A). La dinámica de población de las cepas de no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* fueron similares durante la FAL. En general la

población de levaduras no-*Sacharomyces* disminuye al final de FAL, en especial las cepas de *H. uvarum*, las cuales disminuyeron hasta poblaciones de 10^4 UFC/mL. *S. cerevisiae* en cambio aumenta ya des del momento en que es inoculada. Esta dinámica de población es principalmente consecuencia de la relación competitiva entre no-*Saccaromyces* y *S. cerevisiae.*[2]



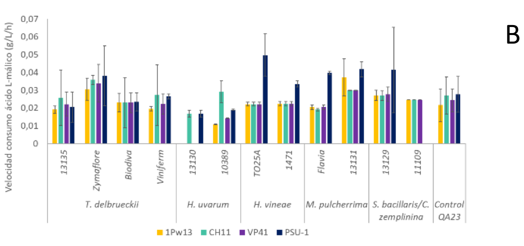


Figura 1. Velocidades de FAL (A) y FML (B). Valores medios con desviación estándar.

En las FML se pudieron ver diferencias tanto a nivel de la FAL de la cual partían, como de la cepa de *O. oeni* inoculada (Figura 1B). Se observó que las cepas de *O. oeni* tenían menor capacidad fermentativa cunado actuaban en los vinos elaborados por las cepas de *H. uvarum*. Incluso algunas cepas, 1Pw13 y VP41, no fueron capaces de iniciar la FML en los vinos elaborados con la cepa 13130 de *H. uvarum*. De forma similar se observó en los vinos elaborados con la cepa 11109 de *S. bacillaris*, donde PSU-1 no fue capaz de consumir el ácido L-málico. En relación con la viabilidad de las cepas de *O. oeni*, su población incremento de 10^7 a 10^8 UFC/mL y esta viabilidad se mantuvo hasta el final de fermentación. No obstante, en los vinos donde no arrancó la fermentación, la población de *O. oeni* pasadas 48h era de 10^2 UFC/mL.

Con relación a la composición de los vinos a final de FAL, las cepas de *H. uvarum, S. bacillaris* y *H. vineae* fueron las que generaron un vino más distinto al control. En cambio, las cepas de *M. pulcherrima* y *T. delbrueckii* generaron un vino más similar. A final de FAL, los vinos elaborados por las cepas 13130 de *H. uvarum* y 11109 de *S. bacillaris* presentaron altas concentraciones de SO_2 y ácido acético. Estos compuestos, a ciertas concentraciones son tóxicos para *O. oeni* y esto podría explicar, porque algunas cepas de *O. oeni* no pudieron fermentar en estos vinos.[3] Además, en todos los casos hubo un consumo del ácido L-málico por parte de las cepas no-*Saccharomyces.* A final de FML, el incremento del pH fue superior en los vinos de fermentación secuencial. Este incremento fue superior en los vinos elaborados con cepas de *S. bacillaris.* Además, durante la FML, *O. oeni* consumió prácticamente todo el ácido cítrico, traduciéndose en una producción de ácido acético.[4] Esta producción fue más importante en los vinos de FAL secuenciales con las cepas 11109 de *S. bacillaris* y 1471 de *H. vinenae*.

En conclusión, algunas de las cepas de no-*Saccharomyces* utilizadas, especialmente cepas de *H. uvarum* y *S. bacillaris* pueden afectar la composición del vino, tanto a final de FAL como de FML y por lo tanto parecen ejercer un efecto sobre la FML y las cepas de *O. oeni* utilizadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con el soporte del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, la Agencia Española de Investigación y la Fundación del Desarrollo Regional Europea (AGL2015-70378-R).

REFERENCIAS

[1] S. Benito, T. Hofmann, T. Laier, M. Lochbühler, A. Schüttler, A. Ebert, et al., *Eur. Food Res. Technol.*, **2015**, *241*, 707-717.

[2] G. Beltran, M. J. Torrija, M. Novo, N. Ferrer, M. Poblet, J. M. Guillamón, et al., *Syst. Appl. Microbiol.,* **2002,** *25*, 287-293.

[3] C. Reguant, R. Carraté, M. Constantí, A. Bordons, *FEMS Microbiol. Lett.,* **2005**, *246*, 111-117.

[4] E. J. Bartowsky, *Aust. J. Grape Wine Res.,* **2005**, *11*, 174-187.

PRODUCCIÓN DE ACEITUNA DE MESA SICILIANA CON CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES

Vaccaluzzo A.[1], Benitez-Cabello A.[2], Pino A.[1], Caggia C.[1], Arroyo-López FN.[2], Randazzo C.L.[1], Bautista-Gallego J.[2]

1 Department of Agricultural, Food and Environment, University of Catania (Italy)

2 Departamento Biotecnología de Alimentos, Instituto de la Grasa-CSIC, Sevilla (España)

joaquinbg@ig.csic.es

Introducción

Las aceitunas de mesa son consideradas las verduras fermentadas más diseminadas en el área mediterránea, aumentando además su consumo anual constantemente en todo el mundo. En Sicilia, la fermentación de este producto se realiza principalmente por métodos tradicionales, mediante la microbiota autóctona. Las aceitunas se colocan directamente en salmuera y la hidrólisis de la oleuropeína se lleva a cabo mediante la actividad enzimática de dichos microorganismos, la cual está influenciada por las diferentes condiciones del proceso (contenido sal, pH, condiciones aerobiosis/ anaerobiosis, etc.). Debido a estas razones, la utilización de cultivos iniciadores podría ser útil para controlar el proceso de fermentación y mejorar la calidad del producto final [1, 2, 3].

Además, uno de los principales objetivos de la industria alimentaria es la producción de alimentos con bajo contenido en cloruro sódico (NaCl), siendo la aceituna de mesa uno de los alimentos bajo estudio. Se ha comprobado que mediante la reducción [4] o sustitución [5] del NaCl, se obtiene un producto final estable desde el punto de vista microbiológico y con unas características sensoriales mejoradas.

Este estudio tuvo como objetivo producir aceitunas de mesa sicilianas con bajo contenido en sal, utilizando una cepa con actividad β-glucosidasa, para obtener un producto final con características organolépticas mejoradas.

Materiales y métodos

Elaboración en planta piloto

Se utilizaron aceitunas de la variedad Nocellara Etnea, las cuales sufrieron una primera etapa de lavado para posteriormente colocarlas directamente en salmuera estéril, conteniendo 5% u 8% (w/v) de NaCl. Se utilizaron dos cepas diferentes, *Lactobacillus plantarum* F3.3, con actividad β-glucosidasa, y la cepa con potencial probiótico *Lactobacillus paracasei* N24 (Di3a).

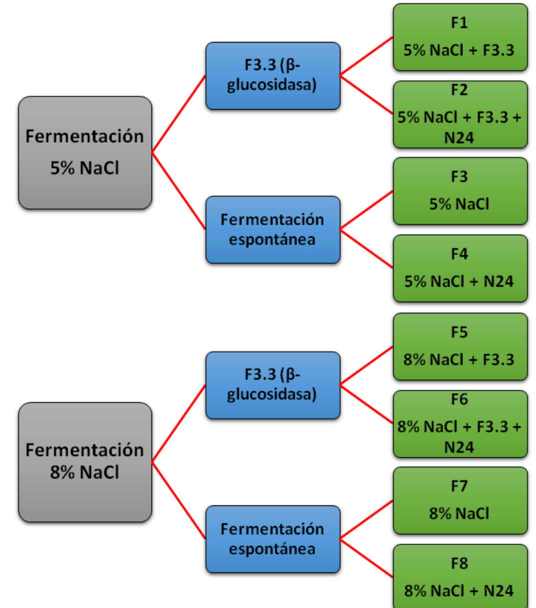


Figura 1: Esquema del diseño experimental.

El diseño experimental (Figura 1) consistió en 8 tratamientos: 4 fermentaciones al 5% de NaCl con y sin la adición del inóculo, y 4 fermentaciones al 8% of NaCl con y sin la adición del inóculo. La cepa *L. paracasei* N24 fue inoculada en 4 fermentadores (2 al

5% y otros 2 al 8% de NaCl) después de 60 días de fermentación. Todas las fermentaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (18±2°C), y monitorizadas durante 120 días.

Análisis microbiológico

Se tomaron muestras de salmuera a los 1, 30, 60, 90 y 120 días de fermentación, sembrando las diferentes diluciones decimales en PCA para bacterias mesófilas totales; MRS agar, suplementado con cicloheximida (5 ml/l), para bacterias lácticas (BAL); YM agar suplementado con oxitetraciclina y sulfato de gentamicina para levaduras; MS Agar para estafilococos; y MC para *Escherichia coli*.

Aislamiento, identificación y caracterización de BAL y levaduras

Durante todo el estudio se aislaron al azar un total de 600 colonias de BAL y 200 colonias de levaduras. En el caso de las BAL, se extrajo el ADN y se identificaron mediante el protocolo propuesto por Torriani y col. (2001) y confirmados mediante secuenciación. Para evaluar la supervivencia de *L. paracasei* N24 se llevó a cabo una Rep-PCR usando el cebador GTG_5 (Gevers y col., 2001).

Para la caracterización de las levaduras se llevó a cabo el mismo protocolo que se ha explicado anteriormente para BAL. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa informático Bionumerics 6.6 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Para confirmar el análisis de agrupamiento e identificar las levaduras, se llevó a cabo la secuenciación de la región D1/D2, como propuso Arroyo-López y col. (2006). Para el estudio de las diferentes secuencias obtenidas se empleó el programa informático MEGA 5.0.

Panel sensorial

El análisis sensorial fue llevado a cabo por un panel de cata entrenado, formado por diez catadores (6 mujeres y 4 hombres, entre 22 y 40 años), siguiendo el método propuesto por IOC (2011). Se evaluaron los posibles aspectos negativos además de realizar un análisis descriptivo a cada muestra proporcionada a los catadores. También se añadió la aceptación general del producto como un parámetro indicativo de la calidad general del producto.

Resultados

Identificación y Rep-PCR

Un total de 84 aislados de BAL correspondieron a la cepa *Lactobacillus paracasei* N24.

En el caso de las levaduras, se llevó a cabo un agrupamiento en el que se detectan 19 grupos diferentes, de los cuales 9 de ellos agrupan casi el 85% de todos los aislados. Los grupos más numerosos pertenecen a las especies *WicKerhamomyces anomalus, Candida boidinii*, y *Candida diddensiae*, aunque también se identificaron representantes de *Pichia kluyveri* y *Meyerozyma guillermondii*.

Análisis sensorial

Results of sensory analysis are reported no off-odours were detected in any samples. Overall, regarding the gustatory sensations (acidity, saltiness and bitterness), differences among samples at different salt content were detected.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Consoli srl por proveer las aceitunas de la variedad Nocellara Etnea. J. Bautista-Gallego agradece al MINECO por su contracto posdoctoral (Juan de la Cierva-Incorporación).

REFERENCIAS

[1] F.N. Arroyo-López, A. Querol, J. Bautista-Gallego, A. Garrido-Fernández. *Int. J. Food Microbiol.*, **2008**, *128*, 189-196.

[2] A. Bevilacqua, L. Beneduce, M. Sinigaglia, M.R. Corbo. *J. Food Sci.*, **2013**, *78*, M742-M751.

[3] S. Bonatsou, A. Benítez, F. Rodríguez-Gómez, E.Z. Panagou, F.N. Arroyo-López. *Food Microbiol.*, **2015**, *46*, 66-73.

[4] A. Pino, M. De Angelis, A. Todaro, K.V. Van Hoorde, C.L. Randazzo, C. Caggia. *Frontiers Microbiol.* **2018**, *9*, article number 1125.

[5] J. Bautista-Gallego, K. Rantsiou, A. Garrido-Fernández, L. Cocolin, F.N. Arroyo-López. *J. Food Sci.* **2013**, *78*, 1095–1100.

[6] D. Gevers, G. Huys, J. Swings. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2001**, *205*, 31–36.

SESIÓN 2B. TECNOLOGÍAS EMERGENTES EN SEGURIDAD ALIMENTARIA

BIOCONSERVACIÓN Y TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS EN LA INACTIVACIÓN DE PATÓGENOS EN ALIMENTOS

Medina Margarita
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Departamento de Tecnología de Alimentos. Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid
mmedina@inia.es

La demanda por los consumidores de productos menos procesados, de alta calidad nutritiva y sensorial, con mayor vida útil, y al mismo tiempo con menos aditivos y conservantes, junto con la necesidad de mejorar la calidad microbiológica de los alimentos, han impulsado el avance de tecnologías de conservación no térmicas como alternativa a los tratamientos térmicos. De ellas, algunas ya están muy implantadas comercialmente, como las altas presiones hidrostáticas, otras se encuentran en fase avanzada de desarrollo.

Las enfermedades asociadas a alimentos contaminados continúan siendo motivo de preocupación sanitaria y económica. Entre los principales patógenos alimentarios destacan *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* STEC y *Listeria monocytogenes* [1]. La listeriosis es una de las infecciones más severas (mortalidad del 20-30%), con una incidencia baja pero en aumento en los últimos años. El 99% de los casos de listeriosis se asocian al consumo de alimentos listos para su consumo (RTE, del inglés ready to eat). La prevalencia del patógeno en el ambiente de la industria alimentaria hace muy difícil, si no imposible, su erradicación [2]. Es necesario reducir su presencia en estos alimentos a través de distintas estrategias de inactivación que minimicen los cambios sensoriales y nutritivos en estos productos.

La bioconservación se basa en la extensión de la vida útil y la mejora de la seguridad de los alimentos a través de la microbiota natural o añadida y sus productos antimicrobianos, o de bacteriófagos. Las bacteriocinas de bacterias lácticas son péptidos antimicrobianos de síntesis ribosomal exportados al medio extracelular, con efecto antibacteriano frente a bacterias relacionadas [3]. Pueden añadirse purificadas o semipurificadas como bioconservantes, o inocular las cepas bacteriocinogénicas como cultivo iniciador, cultivo adjunto o cultivo protector. También se ha ensayado su incorporación en envases o películas activas. Su espectro antimicrobiano puede extenderse a Gram negativos mediante estrés químico o físico de la estructura lipopolisacarídica de su membrana externa. Actúan a nivel de membrana, Inhiben la síntesis de peptidoglicanos y/o forman poros, causando pérdida del potencial de membrana y muerte celular. La reuterina es un antimicrobiano producido por algunas cepas de *Lactobacillus reuteri* a partir de glicerol [4], que cuenta con un amplio espectro de actividad y potencial interés en alimentos. En cuanto al empleo de bacteriófagos y sus endolisinas como antimicrobianos, una de sus ventajas es su alta especificidad, con impacto mínimo en el resto de la microbiota [5]. Pueden aplicarse en alimentos mediante pulverización, inmersión o inmovilización, individualmente o en combinación con otros antimicrobianos, así como en la eliminación de biofilms en la industria.

El tratamiento por altas presiones hidrostáticas (APH) somete al alimento a presiones entre 400-600 MPa, con el agua como fluido transmisor. La presión solo modifica enlaces no covalentes, no deteriora nutrientes termolábiles ni altera compuestos de bajo peso molecular

responsables del sabor y aroma. Se emplea como tecnología post-envasado de productos RTE. Causa daños en membranas, desnaturalización proteica y estrés oxidativo. La pérdida parcial de funcionalidad o el daño producido en la membrana no necesariamente conducen a la muerte celular; las bacterias supervivientes pueden experimentar una mayor sensibilidad a sustancias inhibidoras, tales como cloruro sódico, sales biliares e ingredientes de medios selectivos. La respuesta de los microorganismos a las altas presiones depende de la presión, la temperatura, el tiempo de aplicación del tratamiento, las diferencias intra e inter-especies, la fase de crecimiento, etc. El efecto de la matriz alimentaria es variable. La baja actividad de agua, el alto contenido en grasa y proteína y la concentración alta de solutos pueden aumentar la barotolerancia, reducir la inactivación y afectar a la recuperación de las células dañadas subletalmente durante el almacenamiento.

Otros tratamientos, como los pulsos eléctricos de alto voltaje producen electroporación temporal o permanente de las membranas celulares. Se aplican a alimentos líquidos que fluyen entre dos electrodos. Los pulsos de luz inducen reacciones fotoquímicas y fototérmicas, inactivando microorganismos en superficies de alimentos y materiales. El plasma atmosférico no térmico se genera mediante la aplicación de un campo eléctrico o electromagnético a un gas. Su actividad antimicrobiana se basa en el efecto oxidativo de las especies reactivas generadas en la membrana y en su difusión al citoplasma.

La combinación de varios métodos antimicrobianos [6, 7] para mejorar la eficacia de los tratamientos individuales y minimizar los efectos adversos en las características sensoriales de los productos es particularmente interesante en el caso de las altas presiones, que pueden aplicarse con estrategias de bioconservación para incrementar la letalidad, ampliar el espectro antimicrobiano y evitar la recuperación de las células dañadas, incluso tras almacenamiento a temperaturas de abuso. Además de bacteriocinas y sus cultivos productores, se han ensayado compuestos como reuterina, extractos de plantas, antimicrobianos de origen animal como el sistema lactoperoxidasa, bacteriófagos, etc., en aplicación de esta tecnología de barreras.

Los procesos tecnológicos deben ser optimizados para cada tipo de alimento y patógeno diana. La composición de la matriz alimentaria puede incrementar la resistencia microbiana a los tratamientos. El impacto de los métodos de conservación en la fisiología y el comportamiento de los microorganismos en los alimentos, el daño subletal y la virulencia e invasividad, deberán ser tenidos en cuenta en las nuevas estrategias basadas en métodos combinados con el fin de mejorar los procesos y diseñar procedimientos más eficaces para resolver muchos de los problemas actuales relacionados con la seguridad microbiológica de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Proyectos AGL2010-16600, RTA2013-00070-C03-01, RTA2017-00027-C03-01

REFERENCIAS

[1] EFSA & ECDC. *EFSA Journal*, **2017**, *15*(12):5077

[2] RL Buchanan, LGM Gorris, MM Hayman, TC Jackson, RC Whiting. *Food Control*, **2017**, *75*, 1-13

[3] P Alvarez-Sieiro, M Montalbán-López, OP Kuipers. *Appl Microbiol Biotecnol*, **2016**, *100*, 2939-2951

[4] S Vollenweider, C Lacroix. *Appl Microbiol Biotechnol*, **2004**, *64*, 16-27

[5] S Mills, RP Ross, C Hill. *FEMS Microbiol Rev*, **2017**, *41*, S129-S153.

[6] L Leistner, LGM Gorris. *Trends Food Sci Technol*, **1995**, *6*, 41-46.

[7] TL Coutinho de Oliveira, ALS Ramos, EM Ramos, RH Piccoli, M Cristianini. *Trends Food Sci Technol*, **2015**, *45*, 60-85.

CARACTERIZACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS SIN NECESIDAD DE CULTIVAR: HACIA UNA NUEVA ERA MOLECULAR EN BIOSEGURIDAD ALIMENTARIA

Mira-Miralles Marina, Martínez-García Manuel

[1]Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología, Universidad de Alicante. C/San Vicente s/n. San Vicente del Raspeig, 03080, Alicante

marinamm2704@gmail.com

Las nuevas técnicas de secuenciación masiva de DNA se han ido extendiendo a lo largo de estos últimos años hasta la microbiología de los alimentos para evaluar la diversidad microbiana y determinar la presencia de patógenos transmitidos por los alimentos [1-3]. Aquí, hemos aplicado la metodología *Illumina* [4] para secuenciar el gen rDNA 16S y, así, poder estudiar la diversidad bacteriana y desvelar los posibles microorganismos en las conocidas marcas de lechugas embolsadas de Consum, Florette y Mercadona, que son de alto consumo en nuestra sociedad. Además, a partir de una extracción de RNA, se realizó una RT-PCR del rRNA 16S y su posterior secuenciación masiva, con el fin de desvelar aquellos microorganismos que estaban además potencialmente activos. Paralelamente, se utilizaron métodos convencionales basados en cultivos microbiológicos para detectar la posible presencia de algunas bacterias patógenas como *Salmonella enterica* [5], *Shigella* o *Escherichia coli* [6].

Los datos moleculares indicaron que, en general, la diversidad microbiana determinada a partir de la secuenciación del rDNA y rRNA 16S fue bastante homogénea entre las tres muestras, lo que indica que todas las marcas presentan una diversidad bacteriana y una comunidad de bacterias metabólicamente activa muy similar. *Pseudomonas spp*. fue claramente la bacteria más abundante (aproximadamente el 50% de toda la comunidad bacteriana) y potencialmente activa en todas las muestras analizadas (con una abundancia del 80% aproximadamente en todas las muestras), seguida de otros géneros menos predominantes pertenecientes a las enterobacterias, como *Pantoea* o *Rhanella*. Además, los datos de cultivo microbiano y los moleculares fueron congruentes y confirmaron la ausencia de patógenos bacterianos conocidos transmitidos por los alimentos en todas las muestras analizadas.

Sin embargo, mediante las técnicas moleculares se identificó una nueva especie de *Yersinia*, desconocida hasta la fecha, muy estrechamente relacionada con el patógeno psicrófilo *Y. enterocolítica* (96% de identidad), que estaba presente y activa en todas las muestras analizadas con muy baja frecuencia. Aún a pesar de la baja abundancia y, únicamente en el caso de que se demostrara que es una especie patógena, sería conveniente valorar el riesgo que pudiera suponer para el consumo humano. Así pues, si este nuevo grupo de *Yersinia spp*. es potencialmente patógeno sigue siendo una pregunta abierta que necesita más investigaciones.

Por tanto, en este estudio se ha querido ir más allá y demostrar la importancia que tiene el uso de las tecnologías masivas de secuenciación de DNA para analizar los alimentos que nos comemos, dándonos una información mucho más completa sobre qué microbiota se encuentra presente y activa en los alimentos con un elevado consumo en nuestra sociedad,

abriéndonos las puertas hacia una nueva era molecular en Bioseguridad Alimentaria.

REFERENCIAS

[1] Weiss A, Scheller F, Oggenfuss M, Walsh F, Frey JE, Drissner D and Schmidt H. *J Microbiol Biotech Food Sci*. **2016**; *5* (3): 271-276.

[2] Jackson CR, Randolph KC, Osborn SL and Tyler HL. *BMC Microbiology*. **2013**; *13* (274): 1-12.

[3] Söderqvist K, Osman O, Wolff C, Bertilsson S, Vågsholm I and Boqvist S. *Infection Ecology & Epidemiology*. **2017**; *7* (1): 1-9.

[4] Shokralla S, Spall JL, Gibson JF and Hajibabaei M. *Molecular Ecology*. **2012**; *21*: 1794–1805.

[5] Lauer WF and Martinez FL. *J AOAC Int.* **2009**; *92* (6): 1871-5.

[6] Lauer WF, Martinez FL and Patel A. *J AOAC Int*. **2007**; *90* (5): 1284-315.

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E Y EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD MEDIANTE RT-qPCR DE VIABILIDAD

Randazzo W.[1,2], Vasquez-García A.[3], Bracho MA.[4,5], Alcaraz MJ.[6], Aznar R.[1,2,7], Sánchez G.[2]

1 Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València.
2 Departamento de Seguridad y Conservación de Alimentos, IATA-CSIC.
3 Facultad de Zootecnia e Ingeniería de Alimentos, Universidad de San Pablo, Brasil.
4 Unidad Mixta de Investigación Infección y Salud Pública, FISABIO-Salud Pública, Universitat de València.
5 CIBER Epidemiología y Salud Pública, Valencia, España.
6 Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario.
7 Colección Española de Cultivos Tipo, Universitat de València.
conwra@iata.csic.es

Resumen
El virus de la Hepatitis E (VHE), agente causal de la hepatitis E, se considera un patógeno emergente en Europa debido al creciente número de casos declarados en los últimos años. La principal vía de transmisión de este virus es el consumo de agua contaminada y, siendo un agente zoonótico, el consumo de carne de cerdo y jabalí, cruda o poco cocinada, constituye también un factor de riesgo elevado.

Por lo tanto, resulta importante validar métodos para (i) detectar el VHE en alimentos y (ii) evaluar su potencial infectividad. En este estudio, el método oficial ISO 15216 [1] para la detección de virus en alimentos ha sido validado para detectar y cuantificar VHE en vegetales demostrando niveles de recuperación de 1,29, 0,46, y 3,95% en lechuga, espinacas y pimientos, respectivamente, con un límite de detección promedio de $1,5 \times 10^5$ unidades internacionales/25 g. Por otra parte, a falta de un método robusto de cultivo celular para VHE, ciertos ensayos moleculares, como la RT-qPCR acoplada a reactivos de viabilidad, permiten discriminar entre virus infecciosos e inactivos. Por lo tanto, se evaluaron diversas concentraciones de PMAxx y $PtCl_4$ como reactivos de viabilidad, resultando el $PtCl_4$ a 500 µM capaz de discriminar los VHE infecciosos de los inactivados mediante tratamientos térmicos o altas presiones.

Materiales y métodos

Virus, extracción y RT-qPCR de viabilidad

Se empleó el estándar internacional de VHE (OMS 6329/10) y cinco muestras clínicas (suero y heces). Además, se utilizó el mengovirus como control de proceso y el virus de la hepatitis A (VHA) como modelo cultivable. La extracción de ARN viral se llevó a cabo utilizando el kit NucleoSpin® RNA Virus (Macherey-Nagel GmbH & Co.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó mediante el kit RNA UltraSense One-Step (Invitrogen, SA) o el HepatitisE @ceeramTools kit Ceeram (Biomerieux, Francia) con cebadores, sondas y condiciones descritas por [2], [3] y [4] utilizando el LightCycler480 (Roche Diagnostics).

El PMAxx (Biotium, EE. UU.) y el cloruro de platino (IV) ($PtCl_4$) (Acros Organics, EE.UU.), se utilizaron como marcadores de viabilidad antes de las extracciones de VHE sometidos a tratamientos térmicos (60, 72 y 95 °C) y de altas presiones (HPP, 500 MPa) como descrito por [5] y [6], respectivamente.

Validación de la recuperación de VHE en vegetales

Para evaluar diferentes protocolos para recuperar el VHE en vegetales, se inoculó la superficie de lechugas con una suspensión

fecal positiva para VHE ($2,0 \times 10^6$ unidades internacionales, UI), añadiendo el mengovirus como control de proceso. Se utilizaron tres procedimientos para evaluar la recuperación del VHE: el descrito en la ISO [1], el de la ISO con un volumen de elución incrementado (40 ml para cubrir toda la superficie vegetal) y uno anteriormente descrito capaz de detectar simultáneamente virus entéricos y bacterias transmitidas por alimentos [7].

Resultados y Discusión

Inicialmente, se evaluaron tres ensayos de RT-qPCR diferentes [2;3;4] utilizando el estándar internacional, resultando los ensayos [3] y [4] capaces de detectar $2,5\times10^2$IU/ml, mientras que el ensayo [2] mostró una sensibilidad inferior ($2,5\times10^4$IU/ml).

Además, con el fin de establecer un método para detectar y cuantificar el VHE en vegetales, se compararon tres procedimientos, resultando el método ISO ligeramente más eficaz con tasas de recuperación de VHE que variaron entre 2,5% a 5,2%.

	Niveles de HEV inoculados (UI/25 g)			Recuperación de mengovirus (min-max) (%)	$LD_{95\%}$ (UI/25 g)
	$1,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$		
Lechuga	3/3 (1,29±0,81)*	2/3	2/3	11,08 (5,20-18,12)	$2,7 \times 10^5$
Espinacas	3/3 (0,46±0,34)	3/3	2/3	9,64 (3,04-17,36)	$5,2 \times 10^4$
Pimientos	3/3 (3,95±1,12)	3/3	1/3	10,11 (3,61-21,07)	$1,2 \times 10^5$

Tabla 1: Detección del VHE por RT-qPCR en vegetales frescos inoculados artificialmente.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el método de elución descrito en la ISO [1] y la RT-qPCR [4] se validaron en otras matrices vegetales: lechugas, espinacas y pimientos. Las recuperaciones de VHE fueron del 1,29%, 0,46% y 3,95, respectivamente (Tab.1), con un nivel de recuperación de mengovirus superior al 1%, validando así los resultados. Recuperaciones similares han sido descritas para VHA en lechuga [8]. Hay que destacar que los métodos de RT-qPCR detectan el ARN viral de virus tanto infecciosos como inactivados, lo que puede sobreestimar la cantidad de virus infecciosos. Para ello, se comparó la detección de VHE y VHA utilizando $PtCl_4$ y PMAxx previamente a la extracción de RNA. Los resultados sugieren que el PtCl4 es más adecuado para inferir la infectividad de VHE y el PMAxx la del VHA, tanto para tratamientos de inactivación térmicos (Fig.1) como por HPP (Fig.2).

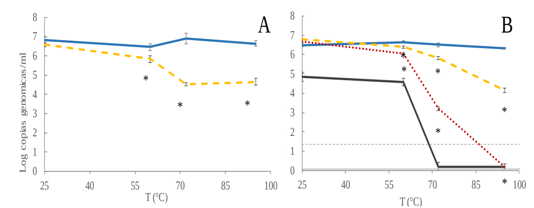


Figura 1: Eficacia de la RT-qPCR (azul), PMAxx-RT-qPCR (rojo), $PtCl_4$-RT-qPCR (amarillo) y cultivo celular (negro) para discriminar entre VHE y (panel A) y VHA (panel B) infeccioso e inactivados térmicamente.

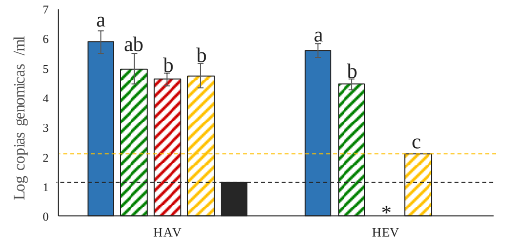


Figura 2: Eficacia de la RT-qPCR (verde), PMAxx-RT-qPCR (rojo) y PtCl4-RT-qPCR (amarillo) para discriminar entre VHE y VHA infecciosos (azul) e inactivados por HPP.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Agricultura e Investigación y Tecnología de Alimentos (INIA) y por el Fondo Social Europeo (Proyecto RTA2014-00024-C03), patrocinado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). V.-G. A. es beneficiaria de una beca del Programa Doctoral Sandwich Exterior (PDSE, 88881.132189/2016-01), financiado por la Agencia Federal Brasileña de Apoyo y Evaluación de Postgrado (CAPES) del Ministerio de Educación de Brasil.

REFERENCIAS

[1] ISO 15216-1. Geneva, Switzerland. **2017**.
[2] N. Jothikumar et al. *Methods*, **2006**, *131*, 65–71.
[3] HepatitisE@ceeramTools kit Ceeram. La Chapelle sur Erdre, France.
[4] J. Schlosser, et al. *Vet. Res.*, **2014,** *45*, 121.
[5] W. Randazzo, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2016,** *229*, 1–6.
[6] A. Fraisse, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2018**, *269*, 64-74.
[7] G. Sánchez, et al. *Int. J. Food Microbiol.,* **2012**, *152*, 9–13.
[8] C. Coudray, et al. *Methods,* **2013**, *193*, 96–102.

EFICACIA BACTERICIDA DEL ÁCIDO DIPICOLÍNICO SOBRE CÉLULAS VEGETATIVAS

Ruiz-Artiga V., Marcén M., Mañas P., Condón S.

Universidad de Zaragoza/Facultad de Veterinaria/Tecnología de los Alimentos/Miguel Servet, 177 50013

vrartiga@unizar.es

Introducción

En la actualidad existe un creciente interés por la búsqueda de sustancias antimicrobianas de origen natural que no induzcan desarrollo de resistencias y que sean inocuas para el consumidor. Accidentalmente observamos que el ácido dipicolínico, compuesto exclusivo de los esporos bacterianos, poseía cierta acción bactericida.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la eficacia bactericida del DPA sobre diversos patógenos alimentarios.

Material y Métodos

Los cepas objeto de estudio fueron: *E. coli* BW25113 y dos cepas mutantes: *ΔRecA* y *ΔDnaK*, *L. monocytogenes* CECT 4032, *S. typhimurium* CECT 878, *S. enteritidis* CECT 4300, *E. faecium* CECT 4932 y *C. sakazakii* NCTC 5920.

Los tratamientos con DPA se aplicaron en agua destilada a las concentraciones, tiempos y temperaturas que se indican en el texto. Las gráficas de supervivencia se modelizaron con la ecuación de Geeraerd *et al.* [1]. Para estudiar el mecanismo de acción se utilizaron: yoduro de propidio (IP), cloruro sódico y sales biliares, para detectar permeabilización en las envolturas celulares, y dihidroetidio (DHE), diacetato 2', 7'-dicloro-dihidro-fluoresceina (H_2DCFDA) y hidroxifenil fluoresceína (HPF), para estudiar la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Resultados y Discusión

Como se muestra en la tabla 1, el DPA resultó un bactericida muy eficaz frente a todas las especies investigadas, tanto G+ como G-, incluso a concentraciones tan bajas como 0,5 mM. A esta concentración *E. coli* resulto la especie más resistente.

Tabla 1: Parámetros de resistencia al DPA a 37ºC.

[DPA] (mM)	KMAX	R^2	RMSE
***E. coli* BW25113**			
0,5	0,066±0,01	0,961	0,149
3	1,322±0,22	1,000	0,055
6	3,658±0,43	0,996	0,112
***S. aureus* CECT 4459**			
[DPA] (mM)	**KMAX**	**R^2**	**RMSE**
0,5	0,134±0,03	0,922	0,314
3	0,611±0,23	0,983	0,321
6	1,437±0,36	0,801	0,941
***S. typhimurium* CECT 878**			
[DPA] (mM)	**KMAX**	**R^2**	**RMSE**
0,5	0,099±0,03	0,993	0,165
3	4,227±0,05	0,991	0,266
***L. monocytogenes* CECT 4032**			
[DPA] (mM)	**KMAX**	**R^2**	**RMSE**
0,5	0,107±0,01	0,933	0,347
3	2,041±0,00	0,993	0,161
***S. enteritidis* CECT 4300**			
[DPA] (mM)	**KMAX**	**R^2**	**RMSE**
0,5	0,119±0,05	0,945	0,438
3	1,766±0,25	0,816	0,558
***C. sakazakii* NCTC 5920**			
[DPA] (mM)	**KMAX**	**R^2**	**RMSE**
0,5	0,089±0,04	0,954	0,305

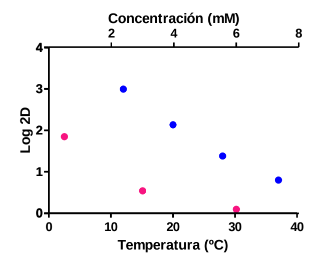


Figura 1. Ritmo de inactivación por DPA de *E. coli* BW25113 a varias concentraciones (●) y temperaturas (●).

La figura 1 ilustra la relación entre la temperatura de tratamiento y de la concentración de DPA con el tiempo necesario para inactivar al 99% de la

población de *E. coli*. En ambos casos se observa una relación exponencial.
La figura 2 ilustra los daños producidos por el DPA en distintas estructura celulares de *E. coli.*

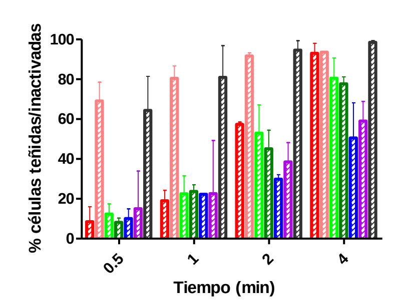


Figura 2. Porcentaje de células de *E. coli* BW25113 tratadas con 3 mM de DPA, teñidas con: IP (●), DHE (●), H_2DCFDA (●) y HPF (●); y de recuperadas en medios no selectivos (●) y selectivos: con NaCl (●) o sales biliares (●).

Como se observa en la figura la mayoría de las estructuras celulares se fueron afectando más cuanto mayor era el tiempo de tratamiento. Los recuentos obtenidos en el medio selectivo con sales biliares demuestran que el DPA producía una rapidísima alteración de la membrana externa que no estaba directamente relacionada con la inactivación celular. Los recuentos obtenidos en el medio selectivo con cloruro sódico demuestran que el DPA producía una alteración progresiva de la membrana citoplasmática. La tinción con fluorocromos demuestra que el tratamiento inducía la aparición de ROS, especialmente de radicales superoxido –tinción con DHE-, en el citoplasma celular. Estos ROS también se producían en *L. monocytogenes,* así como la alteración de la membrana citoplasmática, en este caso superior a la observada en la especie G- (datos no mostrados).
Para estudiar si la formación de ROS estaba relacionada con la muerte o si se generaban como consecuencia de otros daños, se emplearon dos cepas mutantes de *E. coli* (*ΔRecA* y *ΔDnaK*). El gen RecA está implicado en la reparación del ADN y el gen DnaK codifica un sistema de chaperonas que se encarga de reparar los daños de proteínas y contribuye en el control de la respuesta al shock térmico.

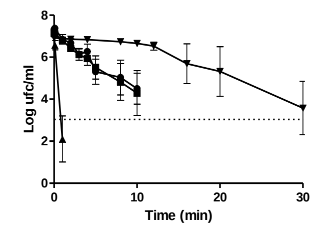


Figura 3. Gráficas de supervivencia al DPA (3mM, 37ºC) de: *E. coli* BW 25113 (●) y los mutantes *ΔRecA* (■) y *ΔDnaK* (▲), y de células de *E. coli* BW 25113 tratadas subletalmente por calor (48ºC, 15min) (▼).

Los datos de la figura 3 indican que la inactivación por DPA no se debe a los ROS, ya que estos compuestos dañan el DNA [2]. Sin embargo, el mutante *ΔDnaK* fue mucho más sensible al DPA, lo que indica daños a las proteínas que el mutante es incapaz de reparar. Los datos obtenidos tras el choque térmico confirman esta observación.
Los resultados de esa investigación demuestran el efecto bactericida del DPA, tanto sobre bacterias Gram positivas como Gram negativas. Los datos indican que este compuesto causa daño en las envolturas celulares y formación de especies reactivas del oxígeno, aunque aparentemente la causa última de la muerte son los daños infringidos a las proteínas y enzimas citoplasmáticos.

AGRADECIMIENTOS
Este estudio ha sido financiado por el proyecto CICYT (AGL 2015-69565-P), FEDER, FSE, Oficina Aragonesa de Ciencia, Tecnología y Universidad.
V. Ruiz es beneficiaria de una beca predoctoral (2016) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

REFERENCIAS

[1] A.H. Geeraerd, V.P. Valdramidis, J.F. Van Impe, *Int. J. Food Microbiol.*, **2005**, *102*, 95-105.
[2] JA Imlay, *Annu. Rev. Biochem.*, **2008**, *77*, 755-76.

PIEZOPROTECCIÓN Y PIEZOESTIMULACIÓN: EFECTOS NO DESEADOS EN LA COMBINACIÓN DE BIOCONSERVANTES Y ALTAS PRESIONES

Serra-Castelló C., Jofré A., Garriga M., Bover-Cid S.
IRTA-Programa de Seguridad Alimentaria. Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells (Girona)
sara.bovercid@irta.cat

Introducción

Entre las alternativas de que dispone la industria alimentaria para controlar *Listeria monocytogenes,* se encuentran los tratamientos de post-letalidad como el procesado por altas presiones (AP) y/o los agentes antimicrobianos como las sales de ácidos orgánicos (AO) en la formulación de sus productos. Los productos cárnicos cocidos pueden someterse a un tratamiento por AP, cuya eficacia debe validarse en cada tipo de producto específico [1], ya que la inactivación microbiana durante el procesado está influenciada por parámetros de proceso (presión, tiempo y temperatura) y por las características intrínsecas del producto que pueden favorecer la letalidad o proteger a los microorganismos, i.e. tener un efecto piezoprotector [2]. En este sentido, la formulación con AO como agentes antimicrobianos puede afectar la letalidad por AP. Además, la potencial aparición de células resistentes después de AP hace necesario tener en cuenta el comportamiento de las bacterias supervivientes en matrices que pueden ofrecer condiciones que favorezcan la recuperación y posterior crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil del producto [3].

Objetivo

Diseñar un estudio a través de un enfoque orientado a producto para comprender la inactivación y el comportamiento de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento de jamón cocido formulado con AO (lactato y diacetato) y tratado por AP.

Metodología

Se elaboró jamón cocido sin AO y con diferentes concentraciones de lactato, diacetato y su combinación, se loncheó, se inoculó con diferentes cepas de *L. monocytogenes* y se envasó al vacío. Para el estudio de inactivación se presurizaron las muestras a 400 MPa durante 9 tiempos de tratamiento diferentes. Para el estudio del crecimiento de *L. monocytogenes*, se presurizaron las muestras a 600 MPa y se almacenaron a 8, 12 y 20°C.

En ambos casos, se utilizó un medio cromogénico para el recuento de *L. monocytogenes.* Las cinéticas de inactivación fueron evaluadas ajustando modelos primarios a los datos de supervivencia para cada formulación y cepa. Para las cinéticas de crecimiento, además de los modelos primarios también se ajustaron modelos secundarios a los datos de crecimiento para cada formulación y cepa.

Resultados

La cinética de inactivación por AP observada para *L. monocytogenes* dependió tanto de la formulación del producto como de la cepa. En general, la presencia de lactato causó una piezoprotección ya que la tasa de inactivación fue menor en el jamón cocido formulado con lactato que en el producto control. Cuanto mayor fue la concentración de lactato, menor fue la tasa de

inactivación. Por el contrario, el diacetato aumentó ligeramente la inactivación de *L. monocytogenes* por AP. Se observó una diferencia notable entre las cinéticas de inactivación de las cepas estudiadas.

Durante la vida útil del jamón cocido elaborado sin AO, la velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* no se vio afectada por la aplicación de AP. Por lo contrario, la fase de latencia fue más larga en muestras presurizadas. El uso combinado de lactato y diacetato inhibió por completo el crecimiento del patógeno a 12 y 20°C. En cambio, la adición sólo de lactato no pudo inhibir completamente el crecimiento de *L. monocytogenes*. Sorprendentemente, se registró un mayor número de muestras que mostraron crecimiento del patógeno (todas las cepas ensayadas) en productos procesados por AP formulados con lactato en comparación con productos control (sin AO). El crecimiento inesperado podría ser el resultado de células resistentes a AP e indicar la presencia de una población heterogénea de *L. monocytogenes* con fracciones piezo-sensibles y piezo-resistentes.

Las velocidades de crecimiento de *L. monocytogenes* en productos tratados por AP y formulados con AO fueron marcadamente más altas que en productos no presurizados con la misma concentración de AO. Este efecto fue más pronunciado a 20°C, donde *L. monocytogenes* creció hasta 4 veces más rápido en comparación con las correspondientes condiciones sin presurizar. Por lo tanto, en presencia de AO se observó una piezo-estimulación pronunciada por el tratamiento por AP.

Conclusiones

El efecto piezo-protector del lactato en la inactivación inmediata por AP de *L. monocytogenes* junto con una mayor velocidad de crecimiento durante la vida útil en jamón cocido procesado por AP que contiene lactato, indica que la formulación con lactato no sería recomendable para productos cárnicos cocidos destinados a ser procesados por AP.

El presente estudio enfatiza la necesidad de un enfoque orientado a producto para el diseño, la evaluación y la implementación del procesado por altas presiones, teniendo en cuenta la formulación específica utilizada para la fabricación del producto.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen ANSES por haber proporcionado las cepas de referencia utilizadas en este estudio (12MOB045Lm y 12MOB089Lm). Este proyecto ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria [ref. INIA-RTA2012-00030] y el programa CERCA/Generalitat de Catalunya.

REFERENCIAS

[1] FSIS. **2014**. FSIS Compliance guideline: controling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Food Safety and Inspection Service. U.S. Department of Agriculture.

[2] Hereu, A., P. Dalgaard, M. Garriga, T. Aymerich & S. Bover-Cid. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol*. **2012**, *16*:305-315.

[3] Jofré, A. & X. Serra. **2016**. Processing of meat products utilizing high pressure p. 591-623. *In* V. M. Balasubramaniam G. V. Barbosa-Canovas i H. Lelieveld (ed.), High pressure processing of food. Principles, technology and applications. Springer-Verlag New York.

USO DE TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS AL HIPOCLORITO SÓDICO PARA MEJORAR LA INOCUIDAD DE FRESAS CONGELADAS Y LISTAS PARA EL CONSUMO

Abadias M.[1], Aguiló-Aguayo I.[1], Colás-Medà P.[1], Nicolau-Lapeña I.[2], Viñas, I.[2]

1 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries/ XaRTA-Postharvest/ Edifici Fruitcentre, Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, Parc de Gardeny, 25003, Lleida.
2 Universitat de Lleida/Departamento de Tecnología de Alimentos/ XaRTA-Postharvest/ Centro Agrotecnio/ Rovira Roure 191, 25198, Lleida.
isabel.abadias@irta.cat

Las frutas y hortalizas frescas, mínimamente procesadas o congeladas pueden ser vehículos de transmisión de patógenos de transmisión alimentaria. Recientemente, en la UE se ha reportado un brote de *L. monocyt*ogenes ligado al consumo de vegetales congelados, que ha afectado a 5 países, 47 personas y ha causado 9 muertos [1]. Actualmente, el hipoclorito de sodio es el desinfectante más ampliamente utilizado en las industrias de transformación de frutas y hortalizas. No obstante, su uso está siendo cuestionado por la posible formación de compuestos derivados, potencialmente cancerígenos y su uso se ha prohibido en algunos. La luz UV y el ozono están emergiendo como posibles tecnologías alternativas, más seguras para el consumidor y más respetuosas con el medioambiente. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de la luz UV en seco (D-UVC) y asistida por agua (W-UVC) y el ozono en la reducción de *Listeria innocua* artificialmente inoculada en fresas.

Para el tratamiento con W-UVC se utilizó un prototipo de luz UV de 12 L de capacidad equipado con 4 lámparas UV (17.2 W), con recirculación de agua y aireación (LAB-UVCGama, UV-Consulting Peschl España, Castellón). El sistema D_UVC fue una cámara cerrada equipada con una lámpara UV. Las fresas se situaron a una altura tal para recibir una radiación ≈ 8 W/m^2. El agua se ozonizó a una dosis aproximada de 0.5 ppm (ORP entre 736-815 mV). Además, se evaluó su efecto bactericida en el agua tras el lavado. Las fresas se inocularon el día anterior del ensayo con 50 µL de una suspensión de 10^{10} ufc/ml de la cepa *L. innocua* CECT-910 (*spot inoculation*) y se trataron mediante las distintas tecnologías durante distintos tiempos. La población de *L. innocua* antes y después del tratamiento se determinó mediante siembra en medio selectivo Palcam. En recuentos por debajo del límite de detección se realizó un enriquecimiento y posterior confirmación en el mismo medio. En el caso del agua, se sembró también en medio selectivo y paralelamente, 1 mL se incubó en 9 mL de Dey-Engley. En los tubos positivos se confirmó la presencia de *L. innocua*.

La población inicial de *L. innocua* en fresa en los distintos ensayos estuvo entre 6.4 y 7.2 log ufc/fresa. La eficacia del tratamiento con W-UVC no aumentó significativamente con el tiempo de tratamiento, con unas reducciones entre 3.8 y 4.9 log ufc/fresa (Fig.1), ni tampoco se observaron diferencias significativas con el control. La radiación medida con el equipo lleno de agua fue de 1.8 W/m^2.

En el caso de la aplicación de D-UVC, la reducción de *L. innocua* sí que aumentó con el tiempo de tratamiento, desde

valores de 1.2 hasta 4.8 log ufc/fresa al cabo de 1 y 10 min, respectivamente.

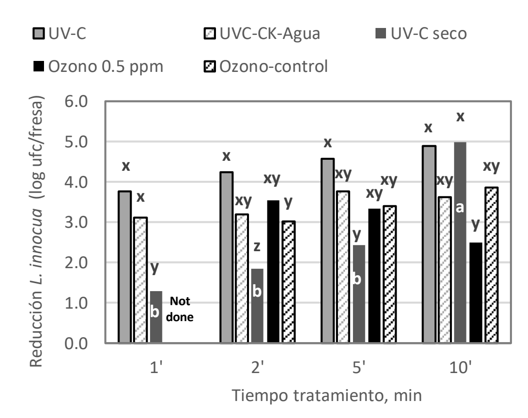


Figura 1: Reducciones *L. innocua* en fresa en los tratamientos realizados. Para cada tiempo, distintas letras (x, y) indican diferencias significativas (P<0.05) entre tratamientos. En los distintos tratamientos, distintas letras (a, b) indican diferencias significativas entre los distintos tiempos.

El tratamiento con ozono no fue significativamente diferente a su control (agua no ozonizada), con unas reducciones entre 2.5 y 3.9 log ufc/fresa (Fig. 1). La reducción con el ozono tampoco se vio aumentada significativamente con el tiempo de tratamiento.

Los resultados demostraron que la luz UVC redujo más la población de *L. innocua* en fresas que el ozono, sin embargo las diferencias solo fueron significativas a los 10 min de tratamiento.

En el agua de lavado del tratamiento con W-UVC, la población de *L. innocua* se redujo significativamente debido a la luz UVC (Tabla 1). Así, la población en el agua en el tratamiento control (con las lámparas apagadas) fue de 3.5-3.9 log ufc/mL, mientras que en el tratamiento con UV, la población estuvo siempre por debajo del límite de detección (<5 ufc/mL). En el caso del tratamiento con ozono, únicamente se realizó detección (no recuento). Los resultados demostraron presencia en prácticamente todas las muestras de agua en el tratamiento control (sin ozono), mientras que en el agua ozonizada solo se detectó *L. innocua* en 2/9 y en 0/9 muestras tras 5 y 10 min, respectivamente.

Tabla1: Recuento (log ufc/g) y/o detección de *L. innocua* en el agua tras los distintos tratamientos.

Tratam.	Dosis	Tiempo			
		1 min	2 min	5 min	10 min
W_UVC	0	3.8±0.6	3.9±0.7	3.8±0.9	3.5±1.0
	1.8 W/m^2	<ld (6/6)*	<ld (5/6)	<ld (1/6)	<ld (3/6)
Ozono#	0		8/9	9/9	9/9
	0.5 ppm		7/9	2/9	0/9
D_UVC	8.0 W/m^2	Nd	Nd	Nd	Nd

Ld: Limite detección 5 ufc/ml (0.70 log ufc/ml)
*: Número muestras positivas/número muestras analizadas
#: No se realizó recuento, solo detección
Nd: no determinado. En D_UVC no se utiliza agua para el tratamiento

En este trabajo se concluye que en los tratamientos aplicados con agua, la eliminación de *L. innocua* de la superficie del fruto se debió a efectos mecánicos (agitación, burbujeo) del sistema de aplicación, y que los microorganismos son eliminados una vez se encuentran en el agua de lavado. El tratamiento con W_UVC presentó mejores resultados que el ozono. El tratamiento con D_UVC es eficaz para la reducción de *L. innocua* en fresa, pero el tiempo necesario para alcanzar reducciones similares es superior.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a MINECO por su apoyo económico (AGL2016-78086-R, FRESAFE), Programa Ramón y Cajal (RYC-2016-19949, I. Aguiló-Aguayo) y Contrato predoctoral formación de doctores (BES-2017-079779, I. Nicolau-Lapeña), a la empresa Empordaigua por el uso del equipo de ozonización del agua, a Marina Anguera por su apoyo técnico y al Programa CERCA (Generalitat de Catalunya).

REFERENCIAS

[1] EFSA. EFSA Supporting Publication **2018**:EN-1448. doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1448

CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE CEPAS DE ENTEROBACTERIAS PRODUCTORAS DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO DE ORIGEN ALIMENTARIO Y CLÍNICO

Alegría A.[1], Natal, I.F. [2], Temprano, M.A. [2], Santos J.A. [1]

1 Universidad de León/Facultad de Veterinaria/Departamento de Higiene y Tecnología de los alimentos. Campus de Vegazana s/n. 24071 León.

2 Complejo Asistencial Universitario de León/Servicio de Microbiología Clínica. Altos de Navas, s/n, 24071 León.

a.alegria@unileon.es

La persistencia de microorganismos resistentes a antibióticos en el ámbito de la industria alimentaria es un grave problema de salud pública ya que contribuye a la propagación de infecciones adquiridas en la comunidad que no responden a los tratamientos de antibioterapia. Dentro de estos microorganismos destacan las enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE), por su importancia como agentes causantes de infecciones humanas y su extensión por la cadena alimentaria[1].

El objetivo de este trabajo es detectar y caracterizar BLEE en muestras de la cadena alimentaria y comparar estos aislados con cepas de origen clínico.

Para ello se recogieron muestras de industrias lácteas y cárnicas (ambiente de la industria, materias primas y productos finales) y también se analizaron microorganismos aislados de alimentos y del ambiente de la industria, procedentes de la propia colección del grupo de investigación. Estas muestras se enriquecieron en un medio no selectivo (TSB) y posteriormente se sembraron en un medio cromogénico diferencial y selectivo para enterobacterias productoras de BLEE (Chromagar ESBL). Se seleccionaron 15 aislados con la morfología típica de *E. coli* que fueron identificados mediante su perfil proteico (Maldi-Tof). Estos aislados se compararon con 15 cepas de *E. coli* de origen clínico humano. Se determinó en ambos grupos la presencia de los genes de β-lactamasas $bla_{\text{CTX-M}}$, bla_{SHV} y bla_{TEM}. La actividad β-lactamasa de espectro extendido se confirmó mediante métodos de sinergia de doble disco: discos de cefotaxima y ceftazidima con y sin el agregado de ácido clavulánico. Finalmente, la tipificación por análisis PFGE y MLST se está empleando para determinar la relación genética entre ambos grupos de microorganismos.

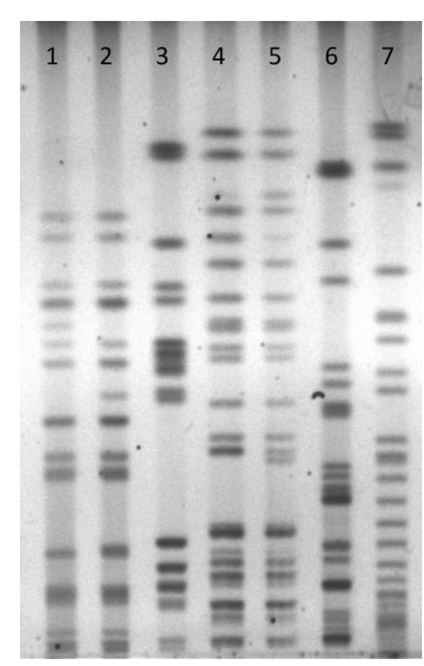


Figura 1: Perfiles de PFGE de 7 aislados de E.coli BLEE+ procedentes de muestras alimentarias. (1-3: Leche de cabra, 4-5: leche de oveja, 6-7: carne de pollo).

La identificación por Maldi-Tof determinó que de los 15 aislados recogidos de las placas del medio cromogénico, 11 se correspondian con la especie *E. coli*, 2 con *Citrobacter freundi*, 1 con *Hafnia alvei* y 1 con *Enterobacter ludwigi.*

En todos los aislados procedentes de alimentos se detectó la presencia de al menos un gen relacionado con la producción de BLEE (13 bla_{TEM} y 5 bla_{CTX-M}), al igual que en los procedentes de muestras clínicas (13 bla_{CTX-M}, 1 bla_{SHV} y 6 bla_{TEM}).

El test de doble disco confirmó la actividad β-lactamasa de espectro extendido en 7 de los aislados de *E. coli* procedentes de muestras alimentarias y en los 15 aislados procedentes de análisis clínico.

El análisis de PFGE y MLST se está llevando a cabo para determinar la relación filogenética entre los diferentes aislados de orígenes cínico y alimentario y poder obtener conclusiones sobre la proximidad filogenética de ambos grupos.

El análisis preliminar del PFGE de las cepas de origen clínico indica que 13 de los aislados son cepas distintas (aunque algunos de ellos muestran proximidad filogenética) y 2 de los aislados no son tipificables por este método. Dos de las 11 cepas de *E. coli* procedentes de alimentos no son tipificables y en el resto se observa una cierta diversidad genética, siendo más próximos los aislados procedentes de muestras relacionadas (Figura 1).

El análisis MLST de las cepas de origen clínico muestra la presencia de algunos grupos clonales de alto riesgo, como el ST131, que presenta una expansión a nivel mundial, tanto en hospitales como en la comunidad y se relacionan con infecciones extraintestinales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado con el apoyo y la finaciación de la Consejería de Educación (Junta de Castilla y Léon) y el "Fondo Europeo de Desarrollo Regional" (FEDER; European Commission) [ref. LE113P17; Es`paña];

REFERENCIAS

[1] EFSA & ECDC. The European Union summary report of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA J.*, **2017**, *15*, 4694-4906

[2] Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout, V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR. *J. Antimicrob. Chemother.*, **2008**, *61*(2):273-281.

AISLAMIENTO DE CEPAS DE *SALMONELLA ENTERICA* RESISTENTES FRENTE A CARVACROL Y ÓXIDO DE LIMONENO

Berdejo D., Sancho D., Pagán E., Pagán R., García-Gonzalo D.
Universidad de Zaragoza-CITA/Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2)/Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de los Alimentos. C/ Miguel Servet, 177, 50013.
Diego.Garcia@unizar.es

Introducción

La elevada actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, y sus constituyentes individuales (CIs), y su uso potencial como conservantes en la industria alimentaria han sido extensamente estudiados y demostrados [1]. Sin embargo, un estudio reciente reveló que la exposición prolongada a estos CIs, a concentraciones sub-inhibitorias, podía permitir la aparición de cepas resistentes de *E. coli* frente a los mismos compuestos de selección [2]. Posteriormente, estas cepas fueron caracterizadas y secuenciadas, con el objetivo de conocer la causa de su resistencia a nivel molecular. Los resultados de secuenciación permitieron conocer las mutaciones responsable del aumento de la resistencia, y de tal modo, se consiguió profundizar en el mecanismo de acción de los CIs [3]. Por ello, el objetivo de este estudio fue aislar cepas resistentes de *Salmonella enterica* mediante la aplicación de carvacrol y óxido de limoneno a concentraciones sub-inhibitorias; y determinar la tolerancia de estos mutantes frente a los CIs.

Material y Métodos

Selección de cepas resistentes

A partir de un cultivo en fase exponencial de *Salmonella enterica* CECT 722 (WT) se realizó una dilución 1:3 en caldo tripticasa soja con extracto de levadura (TSBEL) en presencia de carvacrol (75 µL/L) o de óxido de limoneno (300 µL/L), y se incubó a 37°C durante 24 h. A continuación, se comenzaron los pases en presencia de CIs, que consistieron en diluir el cultivo 1:1.000 en TSBEL estéril con la misma concentración del CI e incubado en las mismas condiciones (37°C/24 h). La selección de las cepas resistentes se realizó tras la exposición de los cultivos a 20 pases en presencia de los CIs. Tras el vigésimo pase, se sembró 0,1 mL en una placa de agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSAEL) y se incubó a 37°C/24 h. De esta placas se obtuvieron las cepas de *S. enterica* seleccionadas con carvacrol (SeCAR) y con óxido de limoneno (SeOXLIM).

Evaluación de resistencia y tolerancia

Aisladas las cepas, se evaluaron sus resistencias y tolerancias, únicamente frente al mismo compuesto de selección; SeCAR frente a carvacrol, y SeOXLIM frente al óxido de limoneno. La caracterización de la resistencia frente a los CIs de las cepas aisladas se llevó a cabo mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y su comparación con la cepa WT. Para determinar la CMI, se añadieron los CIs a tubos con TSBEL a concentraciones de 50-300 µL/L para el carvacrol, y 500-1000 µL/L para el óxido de limoneno. Posteriormente, se inocularon estos tubos con cultivos en fase estacionaria a una concentración inicial de 10^5 UFC/mL, y se incubaron a 37°C durante 24 h. La concentración más baja del compuesto que inhibiera el crecimiento de la bacteria sería establecida como la CMI.

Por otro lado, la tolerancia fue evaluada mediante tratamientos letales de carvacrol y óxido de limoneno en un tampón citrato-fosfato ajustado a pH 4,0 y pH 7,0. Las concentraciones utilizadas en estos tratamientos fueron de 150 y 200 µL/L de carvacrol, y de 750 y 1000 µL/L de óxido de limoneno, a pH 4,0 y 7,0, respectivamente. Se obtuvieron alícuotas, cada 5 min en los tratamientos de carvacrol, y cada 10 min

en los del óxido de limoneno, que fueron consecutivamente diluidas en tampón fosfato salino y sembradas en TSAEL para llevar a cabo el recuento microbiano. Los resultados se corresponden con la media y desviación estándar de tres experimentos realizados de forma independiente.

Resultados y Discusión

A través de los pases se aislaron las cepas SeCAR, en presencia de carvacrol; y SeOXLIM, en presencia de óxido de limoneno. Los resultados de la CMI revelaron un ligero aumento de resistencia (>15%) de las cepas seleccionadas (Tabla 1) en comparación con la WT.

CMI (µL/L)	*WT*	*SeCAR*	*SeOXLIM*
Carvacrol	150	200	-
Óx. limoneno	600	-	700

Tabla 1: concentración mínima inhibitoria (CMI; µL/L) de carvacrol y óxido de limoneno frente a la cepa parental (WT) y las cepas seleccionadas (SeCAR y SeOXLIM).

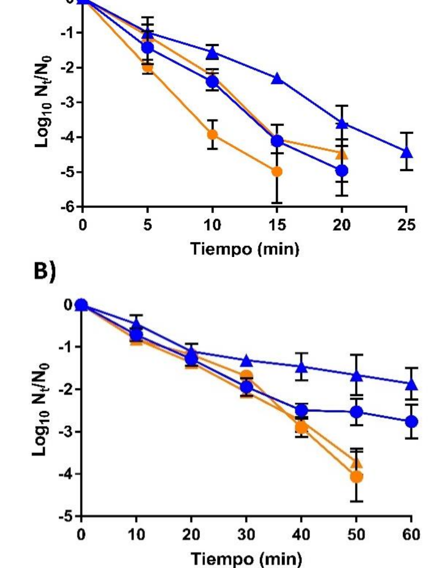


Figura 1: gráficas de supervivencia de la cepa parental (WT;●) y de la cepas seleccionadas (SeCAR, SeOXLIM;▲) frente a tratamientos de carvacrol (A) y de óxido de limoneno (B), a pH 4 (●) y pH 7 (●).

SeCAR y SeOXLIM también mostraron un comportamiento distinto frente a los tratamientos letales (Fig. 1). Mientras que WT mostraba una inactivación de más de 4 ciclos log_{10} a los 15 min de tratamiento de carvacrol a pH 4,0, la cepa SeCAR sólo se redujo en 2 ciclos log_{10}. Este aumento de tolerancia también se observó a pH 7,0: a los 10 min de tratamiento la inactivación de SeCAR era 1,5 ciclos log_{10} inferior a la observada en WT.

SeOXLIM reflejó un aumento de la tolerancia en el tratamiento de óxido de limoneno respecto a WT pero solamente a pH 4,0: a los 60 min SeOXLIM mostró 1 ciclo log_{10} de inactivación menos que WT. Sin embargo, en el tratamiento a pH 7,0, no se observaron diferencias significativas (p>0,05) entre las cepas WT y SeOXLIM.

Conclusiones

El uso de carvacrol y óxido de limoneno permitió aislar cepas de *Salmonella enterica* resistentes (aumento de CMI) y tolerantes (supervivencia en tratamientos letales) frente a los mismo compuestos. El estudio de estas cepas mediante tecnología ómicas permitirá conocer en mayor profundidad los mecanismos de acción de estos antimicrobianos naturales.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha recibido el apoyo financiero de MINECO (Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, Proyecto Nº AGL2015-69565-P), de FEDER, el Fondo Social Europeo, de la Oficina Aragonesa de Ciencia, Tecnología e Investigación de la Universidad (A03-17R); *del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte* (ayuda de formación de profesorado universitario a DB)*; y del Instituto Agroalimentario de Aragón.*

REFERENCIAS

[1] E.L. de Souza, E.T. da Cruz Almeida, J.P. de Sousa Guedes, *Compr Rev Food Sci Food Saf,* **2016**, *15*(4), 753-772.

[2] B. Chueca, D. Berdejo, N.J. Gomes-Neto, R. Pagán, D. García-Gonzalo, *Front Microbiol,* **2016**, *7*, 273.

[3] B. Chueca, A. Renzoni, D. Berdejo, R. Pagán, W.L. Kelley, D. García-Gonzalo, *Appl Environ Microbiol,* **2017**, *257*, 49-57.

POTENCIAL ANTIVÍRICO DEL EXTRACTO DE TÉ VERDE EN RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES EN FRESAS Y FRAMBUESAS

Falcó Irene[1,2], Fabra María José[1], Flores-Meraz Patricia L.[1], Randazzo Walter[1], López-Rubio Amparo[1], Aznar Rosa[1,2,3], Sánchez Gloria[1]

1 Departamento de Conservación y Seguridad Alimentaria, IATA-CSIC, Avda. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, España.

2 Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Av. Dr. Moliner, 50. 46100 Burjassot, Valencia, España.

3 Colección Española de Cultivos Tipo, Universidad de Valencia. Av. Agustín Escardino 9. 46980 Paterna. Valencia, España.

ferrando.falco@uv.es

Introducción

La adición de sustancias naturales antimicrobianas y antioxidantes en recubrimientos comestibles es una buena estrategia para mejorar la calidad y seguridad de algunos alimentos, así como para el desarrollo de nuevos envases libres de aditivos sintéticos.

A pesar de los cuantiosos estudios sobre las propiedades bactericidas y fungicidas de diferentes compuestos GRAS, es muy poca la información que se tiene acerca de si los biopolímeros podrían actuar como portadores de compuestos virucidas [1,2].

Los polifenoles o aceites esenciales son compuestos que han demostrado tener capacidad antivírica [2]. Recientemente, Randazzo et at., [3] demostraron la actividad antiviral del extracto de té verde (GTE) frente a virus de transmisión alimentaria (virus de la hepatitis A (VHA) y norovirus murino (MNV), sustituto de los norovirus humanos). El GTE es un extracto rico en polifenoles obtenido a partir de la planta del té (*Camellia sinensis L.*) de la familia *Theaceae*. A parte de los polifenoles presentes en el GTE, las catequinas son el constituyente mayoritario, las cuales confieren propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antinflamatorias y antimicrobianas contra un gran número de patógenos de transmisión alimentaria [4].

El desarrollo de recubrimientos comestibles con GTE tiene un gran interés en alimentos crudos o mínimamente procesados como frutas y verduras, ya que son alimentos frecuentemente asociados con la trasmisión de virus entéricos [5].

Material y Métodos

Virus y líneas celulares. Los ensayos se realizaron con las cepas MNV-1 y HM-175/18f del VHA en las líneas celulares FRhK-4 y RAW 264.7, respectivamente.

Preparación de los films. Se prepararon dos soluciones de alginato (1%) añadiendo GTE a un ratio 1:0.7 (alginato:GTE) a pH de 5,5 y 7,0. A continuación se añadió ácido oleico (0,5%) y Tween 80 (0,2%). Los controles fueron los films sin GTE.

Determinación de la actividad antiviral. Los films fueron esterilizados durante 15 minutos, posteriormente se sumergieron en 500 µL de suspensión vírica (MNV y VHA) y fueron almacenados durante toda la noche (ON) a 10, 25 y 37ºC, y durante 4 días a 10ºC. Posteriormente las muestras fueron evaluadas en las líneas celulares correspondientes.

Aplicación en fresas y frambuesas. Los films producidos a pH 5,5 rindieron los mejores resultados por lo que se utilizaron para desarrollar los recubrimientos. Se inocularon en superficie fresas y frambuesas con 50 µL de MNV o VHA. A continuación, las frutas se sumergieron en los diferentes recubrimientos (pH 5,5) durante dos minutos. Una vez seco el

recubrimiento, las frutas fueron almacenadas ON a 10 y 25ºC y, posterioremente, durante 4 días a 10ºC. Finalmente, el virus de cada superficie fue recuperado con 5 mL de DMEN suplementado con suero fetal bovino al 10% y cuantificado por cultivo en las líneas celulares correspondientes.

Resultados

Determinación antiviral. La mayor eficacia se observó en los films de GTE a pH 5,5 a 37ºC. Los títulos de MNV se redujeron en 3,42 y 5,76 log $TCID_{50}$/mL a pH 7,0 y 5,5, respectivamente, después de incubar las muestras ON a 37ºC. Las diferencias fueron significativas a 25ºC, mientras que a 10ºC no se observaron diferencias. Para el VHA, los films a pH 5,5 redujeron la infectividad de manera significativa después de incubaciones ON a 25 y 37ºC. Por el contrario, apenas se observó efecto a pH 7,0.

Aplicación en fresas y frambuesas. La infectividad de MNV y VHA en fresas, después haber sido tratadas con los recubrimientos (pH 5,5), se redujo en 1,5 ordenes logarítmicos después de haber sido almacenadas ON a 10ºC. Reducciones de más de 2,5 órdenes logarítmicos se registraron para MNV después de 4 días de almacenamiento a 10ºC (Fig. 1). Para ambos virus la inactivación fue completa después de tratarlos ON a 25ºC. La eficacia de los recubrimientos en frambuesas (Fig. 2) fue ligeramente menor, obteniendo reducciones para MNV de 1,25 y 1,54 log después de almacenamientos ON, y 4 días a 10ºC, y de 1,96 para tratamientos ON a 25ºC.

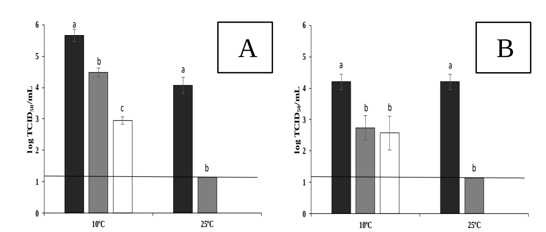


Figura 1. Reducción de la infectividad del MNV(A) y del VHA(B) (log $TCID_{50}$/mL) en fresas después de ser tratadas con recubrimientos de GTE a diferentes periodos de almacenamiento. Barras negras: Control; barras grises: almacenamiento ON; barras blancas: almacenamiento durante 4 días.

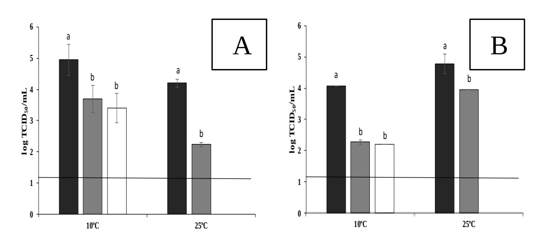


Figura 2. Reducción de la infectividad MNV(A) y del VHA(B) (log $TCID_{50}$/mL) en frambuesas después de ser tratadas con recubrimientos de GTE a diferentes periodos de almacenamiento. Barras negras: Control; barras grises: almacenamiento ON; barras blancas: almacenamiento durante 4 días.

AGRADECIMIENTOS

M.J. Fabra es beneficiaria de un contrato Ramón y Cajal (RYC-2014-158) del Ministerio de Economía de España.

REFERENCIAS

[1] Fabra, M.J., Falcó, I., Randazzo, W., Sánchez, G., López-Rubio, A. (2018). *Food Hydrocolloids*,**2018**, *81*, 96-103.

[2] Randazzo, W., Fabra, M.J., Falcó, I., López-Rubio, A., Sánchez, G.,. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2018**.

[3] Randazzo, W., Falcó, I., Aznar, R., Sánchez, G., *Food Microbiology*, **2017**, *66*, 150-156.

[4] Perumalla, A.V.S., Hettiarachchy, N.S., *Food Research International*, **2011**, *44* (4), 827-839.

[5] Lynch. M. F., Tauxe. R. V., & Hedberg. C. W., *Epidemiol Infect*. **2009**, *137*(3), 307-315.

[6] WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007–2015. WHO Press.

LA ADAPTACIÓN A BIOCIDAS DE *Salmonella* Agona Y *Salmonella* Infantis SE ASOCIA CON CAMBIOS EN LA SUPERFICIE CELULAR Y CON UN INCREMENTO DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

González-Machado C. [1,2], Capita R. [1,2], Alonso-Calleja C. [1,2]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España.

2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León. Calle La Serna, nº 58, 24007-León, España.

carlos.alonso.calleja@unileon.es

Introducción

La salmonelosis de origen alimentario es un serio problema de la salud pública a nivel global [1]. Durante el año 2016 se registraron en la Unión Europea 94.530 casos de salmonelosis humana, en su mayoría asociados con el consumo de huevos, ovoproductos y carne de aves de corral [2]. Si bien esta infección suele tener un comportamiento autolimitante, en los casos más graves es necesario recurrir a una correcta antibioterapia [3]. En este contexto, cobra especial importancia el aumento que está experimentando en los últimos años la prevalencia de resistencia a los antibióticos, dificultando cada vez más la posibilidad de un tratamiento eficaz [4]. El objetivo de este trabajo ha sido determinar si la exposición de *Salmonella* Agona (SA) y *Salmonella* Infantis (SI) a dosis bajas de hipoclorito sódico (HIP) y nitrito sódico (NS) reduce la susceptibilidad de las cepas a los compuestos y, en caso afirmativo, si esta adaptación se asocia con modificaciones en la hidrofobicidad de la superficie celular y en el patrón de resistencia a antibióticos.

Material y Métodos

Las cepas se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de HIP y NS, comenzando por la mitad de la concentración mínima inhibitoria (CMI/2) e incrementando 1,5 veces la concentración de biocida cada 24 horas hasta que dejó de observarse crecimiento. Para el estudio de la hidrofobicidad, se realizaron diluciones en solución salina de concentración 150 mM para lograr unos valores de densidad óptica a 405 nm de entre 0,600 y 0,800 [5]. Se seleccionó el xileno como solvente apolar porque es el que ofrece mejores resultados [6,7].

Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) de los biocidas se establecieron utilizando un método de microdilución en caldo, realizando los ensayos en placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia) y considerando como límite de crecimiento una densidad óptica ($DO_{480\text{-}520}$) de 0,200 tras 48 h de incubación, realizándose las determinaciones en un Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Se determinó, antes y después de la exposición a los biocidas, la CMI de 10 antibióticos (Sigma-Aldrich; EUCAST): gentamicina (CN), cefalotina (KF), cefoxitina (FOX), cloranfenicol (C), enrofloxacina (ENR), vancomicina (VA), eritromicina (E), ampicilina (AMP), tetraciclina (TE) y fosfomicina (FOS).

Resultados y Discusión

Tras la exposición a los biocidas, se observó la adaptación (incremento de la CMI) de SA a NS y de SI a HIP. Se obtuvo una afinidad moderada al xileno (21-50%) en SI y SI adaptada a HIP (SI-HIP), expuestas ambas a HIP, así como en SA adaptada a NS (SA-NS)

crecida en TSB, y una afinidad fuerte (>50%) en el resto de condiciones (Tabla 1).

Condiciones	% Afinidad	Categoría
SI	60,67±10,93	Fuerte
SI expuesta a HIP	44,25±7,55	Moderada
SI-HIP	53,58±14,27	Fuerte
SI-HIP expuesta a HIP	38,32±3,78	Moderada
SA	58,14±4,85	Fuerte
SA expuesta a NS	74,10±2,66	Fuerte
SA-NS	35,51±6,01	Moderada
SA-NS expuesta a NS	66,94±13,48	Fuerte

Tabla 1: Porcentaje de afinidad por el xileno para la valoración de la hidrofobicidad.
SI, *Salmonella* Infantis; SI-HIP, SI adaptada a HIP; SA, *Salmonella* Agona; SA-NS, SA adaptada a NS.

Estos resultados indican que la exposición a HIP disminuyó el porcentaje de afinidad al xileno de SI, tanto en la cepa original como en la adaptada. Por el contrario, la exposición a NS de SA provocó un incremento substancial de los valores de afinidad. En ambos casos, las cepas adaptadas a los biocidas fueron más hidrofílicas que las cepas control, de forma más marcada en el caso de SA.

Los resultados de las CMIs de antibióticos para SI (antes de la exposición a los biocidas) fueron (ppm): 2 (CN), 17 (KF), 8 (FOX), 450 (C), 0,05 (ENR), 600 (VA), 100 (E), 1550 (AMP), 4 (TE) y 50 (FOS). Para SI-HIP las CMIs fueron (ppm): 6 (CN), 16 (KF), 7 (FOX), 450 (C), 0,04 (ENR), 550 (VA), 130 (E), 1400 (AMP), 5 (TE) y 35 (FOS). En el caso de SA se obtuvieron los siguientes valores de CMIs (ppm): 4 (CN), 30 (KF), 10 (FOX), 375 (C), 0,06 (ENR), 700 (VA), 80 (E), 1750 (AMP), 5 (TE) y 55 (FOS). Por su parte, en SA-NS (ppm) los valores fueron: 7 (CN), 35 (KF), 50 (FOX), 12 (C), 4 (ENR), 50 (VA), 2100 (E), 50 (AMP), 3 (TE) y 100 (FOS) (Figura 1). Nuestros resultados concuerdan con los de otros autores [1, 3, 8, 9].

Hay que señalar que SI y SA fueron resistentes (EUCAST) a cinco de los diez antibióticos ensayados: C, VA, E, AMP y FOS. La adaptación de SI a HIP estuvo relacionada con un incremento de las CMIs de CN, E y TE. Paralelamente, SA adaptada a NS presentó mayores valores de CMI que la cepa control para CN, KF, FOX, ENR, E y FOS, destacando el caso de ENR (aumentó un 67%). Es alarmante, en el caso de SA, el hecho de que la cepa presentó sensibilidad a únicamente uno de los antibióticos ensayados: ENR.

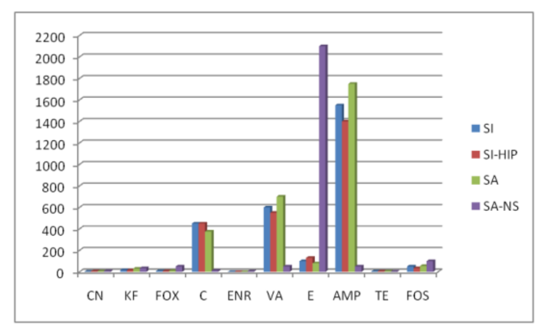


Figura 1: Valores de CMIs de los antibióticos.

Los resultados de este estudio demuestran que la adaptación de las bacterias a dosis subinhibitorias de diferentes biocidas puede reducir su susceptibilidad a los antibióticos, a la vez que produce modificaciones en la superficie celular. Por ello, es importante establecer las dosis adecuadas de uso de estos biocidas en las industrias alimentarias.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA; RTA2014-00045- C03-02), Consejería de Educación (JCyL) y Plan Operativo de Empleo Juvenil (Fondo Social Europeo e Iniciativa de Empleo Juvenil, YEI).

REFERENCIAS

[1] Y. Xu, S. Tao, et al. *Sci. Total Environ.*, **2018**, *616-617*, 90-96.

[2] EFSA-ECDC. *EFSA J.*, **2017**, 15(12), 228 pp. https//doi.org/10.2903/ j.efsa.2017.5077.

[3] D. Molina-González, et al. *Food Control*, **2014**, *40*, 329-334.

[4] R. Capita, C. Alonso-Calleja. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53*, 11-48.

[5] H. Wang, et al. *Food Control*, **2013**, *32*, 650-658.

[6] R. Capita, et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2014**, *80*, 1268–1280.

[7] T. Chia, et al. *J. Food Prot.*, **2008**, *71*, 2421-2428.

[8] M. Gantzhorn, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2014**, *181*, 53-59.

[9] X. Ju, et al. *Food Res. Int.*, **2018**, *107*, 385-393.

EFECTOS DE LOS TRATAMIENTOS POR ALTAS PRESIONES Y FILMS ACTIVADOS SOBRE LA MICROBIOTA DE UN PURÉ DE FRUTAS ALMACENADO EN REFRIGERACIÓN

Grande Burgos M.J., Ortega Blázquez I., Pérez Pulido R., Gálvez A., Lucas López R.
Universidad de Jaén. Departamento de Ciencias de la Salud. Área de Microbiología. Campus Las Lagunillas s/n. 23-71-Jaén
agalvez @ujaen.es

Se determinó el efecto de los tratamientos por altas presiones (APH) y películas activadas con enterocina AS-48 mas timol en la carga microbiana y la diversidad bacteriana de un puré de fruta (plátano, manzana y pera). Se aplicaron tratamientos con APH y envasado en películas activadas solos o combinados, seguido de almacenaje en frío durante 10 días. Tan solo el tratamiento por APH redujo significativamente los recuentos viables. Los resultados de secuenciación masiva sobre la comunidad bacteriana del puré indicaron cuatro grupos principales (*Comamonadaceae,* *Methylobacterium*, *Acidovorax* y *Sphingomonas* por orden decreciente). Al final del almacenamiento se detectó un incremento en la abundancia relativa de *Pseudomonas*. La mayoría de las muestras envasadas con plásticos activados tenían mayores abundancias relativas de los cuatro grupos bacterianos principales indicados anteriormente y una menor abundancia relativa de *Pseudomonas*. La aplicación del tratamiento por APH redujo notablemente las abundancias relativas de los cuatro grupos bacterianos principales. Tras la aplicación de APH aumentó la abundancia relativa de *Lactobacillales*, pero no durante el almacenamiento, mientras que *Pseudomonas* aumentó hacia el final del almacenamiento. El tratamiento combinado (APH y envasado activo) tuvo un mayor efecto sobre la biodiversidad del puré, especialmente sobre *Comamonadaceae* y *Methylobacterium*.

La enterocina AS-48 es un péptido circular de 7.2 kDa con potente actividad antimicrobiana producido por cepas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, cuya estructura, determinantes genéticos y modo de acción han sido estudiados en detalle [1]. La eficacia de esta bacteriocina ha sido comprobada en diferentes sistemas alimentarios. En fruta entera o troceada, la aplicación de tratamientos de lavado con enterocina AS-48 sola o en combinación con otros antimicrobianos fue efectiva en la inactivación de *L. monocytogenes*, como lo demostró el trabajo realizado sobre trozos de fruta entera y frutas en rodajas fresas, frambuesas, moras, melón rebanado, sandía, pera, y kiwi [2]. En zumos de manzana, la aplicación de recubrimientos de quitosano, pectina, goma de xanto o carboximetil celulosa activados con enterocina AS-48 y EDTA mostró buenos resultados en la inactivación de *L. monocytogenes* [3].

Los tratamientos por alta presión hidrostática (APH) figuran a la cabeza entre los métodos no térmicos para procesado de alimentos y la inactivación de microorganismos patógenos. El procesado de determinados alimentos por APH requiere la aplicación de tratamientos de baja intensidad de cara a disminuir su impacto sobre las propiedades del alimento o bien reducir los costes de producción. No obstante, los tratamientos de menor intensidad también son menos efectivos en la inactivación de microorganismos. La eficacia de los

tratamientos por APH pueden mejorarse en combinación con otras barreras, como son los compuestos antimicrobianos naturales, incluyendo las bacteriocinas y aceites esenciales y sus compuestos fenólicos.

En este trabajo se ensayó la eficacia de un tratamiento moderado por alta presión hidrostática (350 megapascales durante 5 minutos) en un puré de verduras envasado en un film control y en otro activado con una mezcla de timol y enterocina AS-48. El tratamiento combinado presentó los mejores resultados en la reducción de la carga microbiana total tras el tratamiento y durante el almacenamiento en refrigeración.

Las secuencias 16SrDNA obtenidas de las muestras mediante secuenciación masiva fueron asignadas a unidades taxonómicas operativas y posteriormente agrupadas a diferentes niveles taxonómicos.

Tabla 1: abundancias relativas (%) de las secuencias obtenidas para las muestras de puré control, almacenadas en film activo (F), presurizadas en un film sin activar (P) y presurizadas en un film activado (FP). Las secuencias están agrupadas a nivel de Orden. Se muestran los resultados obtenidos a tiempo 0 y despues de 10 días bajo refrigeración.

	C0	C10	F0	F10	P0	P10	FP0	FP10
Burkholderiales	38,16	31,34	48,54	49,72	16,86	20,40	11,78	15,08
Rhizobiales	25,02	25,89	37,21	29,69	12,14	13,78	14,28	8,11
Sphingomonadales	7,94	7,86	9,27	4,41	2,17	3,18	1,97	1,50
Pseudomonadales	6,44	11,89	1,03	2,83	10,58	27,65	14,14	11,89
Lactobacillales	3,15	2,59	0,14	6,49	15,26	7,19	12,06	7,77
Bacillales	2,95	4,33	0,33	0,79	8,98	5,34	10,17	12,01
Clostridiales	2,70	2,69	0,64	0,41	0,33	2,44	0,90	0,28
Enterobacteriales	2,54	0,89	0,30	0,19	3,36	0,50	5,00	0,24
Vibrionales	2,48	0,01	0,04	0,00	18,90	0,21	8,18	0,05
Actinomycetales	2,16	2,77	1,14	1,93	1,58	2,91	10,53	9,43
Xanthomonadales	1,42	2,25	0,71	0,36	3,56	9,59	2,95	6,07
Rhodobacterales	1,25	0,00	0,00	0,00	0,06	0,44	0,45	0,25
Alteromonadales	0,80	0,04	0,13	0,00	3,98	0,19	2,19	0,02
Bacteroidales	0,69	0,43	0,00	0,02	0,07	0,76	0,58	0,31

El grupo predominante en las muestras control fue *Burkholderiales*, principalmente la familia *Comamonadaceae*. La abundancia relativa de este grupo disminuyó en las muestras presurizadas con o sin film activo. Algo similar ocurrió con *Rhizobiales* (*Methylobacterium*) y *Sphingomodadales* (*Sphingomonas*). *Lactobacillales, Bacillales* y *Pseudomonadales* mostraron un comportamiento opuesto en las muestras presurizadas, con abundancias relativas superiores a las muestras control y a las tratadas con film activo.

Los resultados de este estudio muestran por una parte la mayor eficacia de los tratamientos combinados, pero también indican que las poblaciones microbianas presentes en los alimentos se comportan de forma diferente dependiendo del tratamiento aplicado, lo que a su vez influye en los cambios que se producen durante el almacenamiento.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por las ayudas UJA2014/06/25 y AGR230.

REFERENCIAS

[1] M. J. Grande-Burgos, R. Pérez Pulido, M. C. López Aguayo, A. Gálvez, R. Lucas, *Int. J. Molec. Sci.* **2014,** *15, 22706–22727*.

[2] A. Cobo Molinos, H. Abriouel, N. Ben Omar, R. Lucas, E. Valdivia, A. Gálvez, *J. Food Prot.* **2008,** *71, 2460–2467*.

[3] M. C. López Aguayo, M. J. Grande Burgos, R. Pérez Pulido, A. Gálvez, R. Lucas, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2016***, 35, 177-183*.

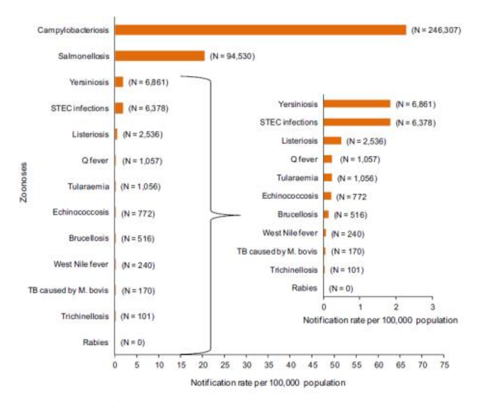
DETECTION OF SALMONELLA VIABLE CELLS BY PCR WITH DNA-INTERCALATING AGENTS IN FOOD

<u>Marco-Aguilar, S.</u>, Rosa, R., Murgui, L., Cantero, V., Ruíz, B.

AINIA, Technology Center, Department of microbiology and bioassays, Parque Tecnológico de Valencia, c. Benjamín Franklin 5-11, E-46890 Paterna (Valencia), Spain.

smarco@ainia.es

Foodborne outbreaks are a serious public health and worldwide food safety concern. For this, there is a great demand for rapid, sensitive, specific and accurate methods to detect microbial pathogens in food. Food companies require analytical results in the shortest time possible, especially in products with limited shelf life. The latest reports issued by RASFF and EFSA evidence the importance of *Salmonella* spp. in human zoonosis (fig.1).



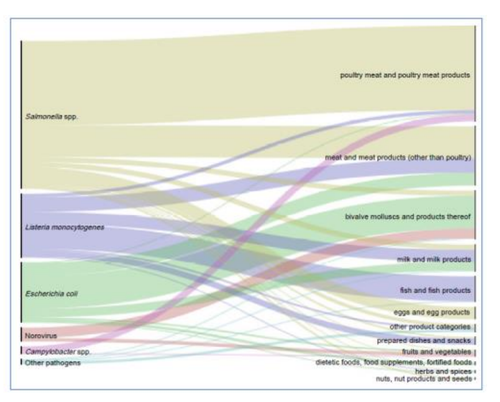


Figure 1: On the left it is represented the number and reporting rates of confirmed zoonoses in humans in the EU in 2016 ([1], the total number of confirmed cases is indicated in parentheses at the end of each bar). On the right the figure indicates the food alerts published in the RASFF in 2016 (RASFF source, [2], the figure shows the microorganisms that cause the poisonings and the foods involved in them).

The reference method for control of *Salmonella* spp. in food, ISO 6579-1:2017, is based on the cultivation of this pathogen in different culture medias, which requires at least 4 days to obtain a result. Nevertheless, alternative methods have been developed to obtain results in only one day, such as PCR technology [conventional and real-time PCR (qPCR)] for the detection of microorganism's DNA. This technology is the most commonly used in the foodborne pathogen detection due to its high sensitivity and specificity. However, the major drawback of the PCR techniques is their inability to differentiate the DNA between dead and viable cells, which is a critical factor for the food industry, regulatory agencies, and the consumer. Therefore, with the PCR technique, the results could be given in a single day only when no DNA of the microorganism is detected. On the contrary, if DNA is detected, it is necessary to carry out an additional phase of confirmation to guarantee that this DNA comes from viable pathogen. To remedy this shortcoming, in this work, we have used DNA-intercalating agents for the detection of viable cells of *Salmonella* spp. in one step, without the confirmation phase (3). These agents have been used to pretreat samples before DNA extraction, to continue with regular DNA preparation and qPCR (4). These molecules could permeate only membrane-compromised cells (dead cells), where they are intercalated in the DNA, inhibiting the PCR process of DNA from no viability cells (fig.2).

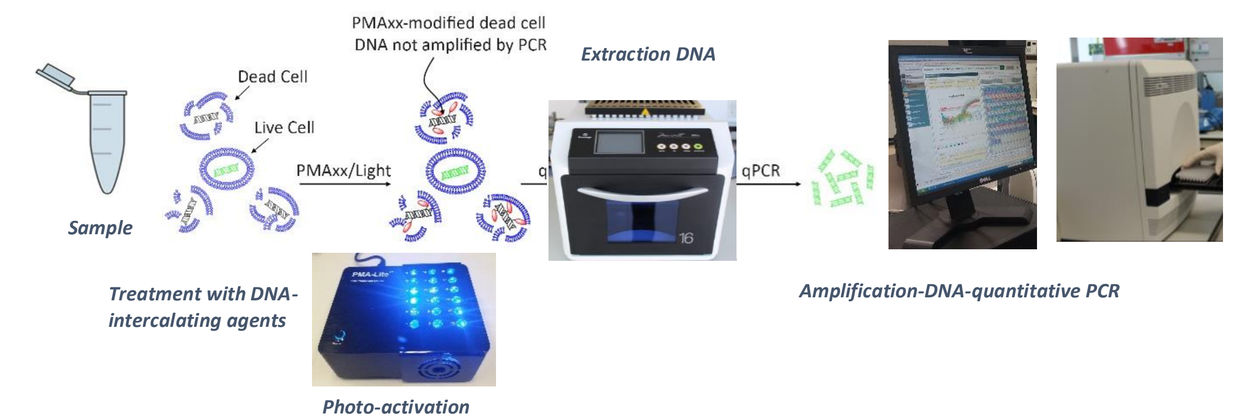


Figure 2. General scheme of the procedure for the application of intercalating agents (v-PCR). Phases: the intercalating agent is incorporated into the sample (aliquot of the enrichment broth); the mixture is placed in the PMA-Lite TM LED (photoactivation) equipment; then the DNA extraction and the PCR process are carried out (DNA amplification).

In this work, the determination of viable cells of *Salmonella* spp. has been carried out both in a growth medium and in food matrices (meat, cheese and vegetable) inoculated with the microorganism (*Salmonella Stanley*, CECT-4141) to levels at 10E+9 colony forming unit (CFU) and 10E+4 CFU. Two types of samples of each matrix have been prepared: one without further treatment; the other one followed a heat treatment (80°C, 10min) to inactivate the inoculated microorganism. Applying this treatment, 5 logarithmic units have been reduced, obtaining levels of 10E+4 CFU and levels lower than 10 CFU. Two DNA-intercalating agents (propidium monoazide (PMA) and Reagent D), previously added to the automated DNA extraction, have been evaluated. All samples have been analyzed using the q-PCR method without DNA-intercalating agents and the v-PCR method with DNA-intercalating agents to compare the results and the Ct values obtained. In addition, sample counts have been made in order to quantify the level of viable *Salmonella* spp.

While the Cts values of non-treated samples were similar in both types of PCR, the samples submitted to a thermal treatment showed Cts values with v-PCR higher than with q-PCR. Even in some cases the counts were less than 10 CFU, where DNA amplifications were not obtained in v-PCR, showing that treatment with DNA-intercalating agents discriminate adequately DNA of viable cells and non-viable. The results show the validity of both agents for the detection of viable *Salmonella* spp. cells in the analyzed matrices. These results agree with the work of other authors ([3,4]).

THANKS TO:





REFERENCES

[1] EFSA European Food Safety Authority. European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA J.,* **2017,** *15*(12):5077.

[2] RASFF- The Rapid Alert System for Food and Feed-2016 annual report. European Commision-Health and Food Safety-2017. PDF ISBN 978-92-79-68052-6 ISSN 2363-0965 doi:10.2875/022237 EW-AC-17-001-EN-N. http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm.

[3] Zeng, D.; Chen Z.; Jiang, Y.; Xue, F. et Li, B. *Front. Microbiol.*, **2016**, *7*, 1833, 1-12.

[4] Elizaquivel, P.; Aznar, R., Sánchez, G. *J. Appl. Microbiol.*, **2013**, *116*, 1-13.

EFECTO DE LA ENCAPSULACIÓN MEDIANTE ZEÍNAS EN LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL ACEITE ESENCIAL THYMUS CAPITATUS EN COMBINACIÓN CON CALOR

Merino N., Berdejo D., García-Gonzalo D., Pagán R.
Universidad de Zaragoza-CITA/Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2)/Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de los Alimentos. C/ Miguel Servet, 177, 50013.
pagan@unizar.es

Introducción

Los aceites esenciales (AEs) son compuestos naturales de origen vegetal que presentan una elevada actividad antimicrobiana, por lo que se ha propuesto su uso como conservante alimentario [1]. No obstante, su empleo presenta algunos inconvenientes como su hidrofobicidad y su inestabilidad química frente a la oxidación. Para solventar estas limitaciones se ha propuesto el uso de tecnologías de encapsulación [2], sin embargo, se desconoce su influencia sobre las propiedades antimicrobianas de los compuestos, o su efecto bajo tratamientos combinados. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la encapsulación del AE *Thymus capitatus* mediante zeínas en su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* O157:H7 Sakai y *Listeria monocytogenes* EGDe, en tampón pH 4,0 y 7,0, y en combinación con calor.

Material y Métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

A partir de crioviales de las cepas *E. coli* O157:H7 Sakai y *L. monocytogenes* EGDe, se sembraron placas de agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSAEL) y se incubaron a 37˚C/24 h. A continuación, se prepararon los precultivos inoculando colonias aisladas en 5 mL de caldo tripticasa soja con extracto de levadura añadido (TSBEL), que se incubaron a 37˚C/12 h/130 rpm. Posteriormente, se diluyeron 1:1000 en 50 mL de TSBEL y se incubaron 37˚C/24 h/130 rpm, para la obtención de las suspensiones microbianas en fase estacionaria.

Tratamientos de inactivación

Los tratamientos se llevaron a cabo en tampón citrato-fosfato a pH 4,0 y pH 7,0, sobre una población inicial de 10^7 UFC/mL. El AE *T. capitatus,* en forma libre o encapsulada, se aplicó a una concentración de 200 µL/L durante 20 min en ambos pHs, frente a *E. coli* y *L. monocytogenes*. Por otro lado, los tratamientos combinados consistieron en el uso simultáneo del AE *T. capitatus* (100 µL/L), libre o encapsulado, y calor (53˚C). Para evaluar el efecto sinérgico fue necesario previamente aplicar estos tratamientos de forma individual. El efecto aditivo fue calculado mediante la suma de la inactivación provocada por ambos tratamientos, aplicados por separado. A lo largo de los tratamientos se obtuvieron alícuotas, que se diluyeron en tampón fosfato salino, y se sembraron en TSAEL para su posterior recuento. Los resultados se corresponden con la media y desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Resultados y Discusión

El *AE T. capitatus* mostró una elevada actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* a pH 4, alcanzando 5 ciclos log_{10} de inactivación tras 8 min de tratamiento (Fig. 1A). Por el contrario, cabe destacar que frente a *E. coli* el AE causó mayor inactivación a pH 7 que a pH 4 (Fig. 1B). Sin embargo, los resultados obtenidos

con los encapsulados de zeínas no produjeron inactivación a ninguno de los pHs testados en *E. coli* y *L. monocytogenes*; a los 20 min de tratamiento no se obtuvo una inactivación superior a 0,3 ciclos log_{10}.

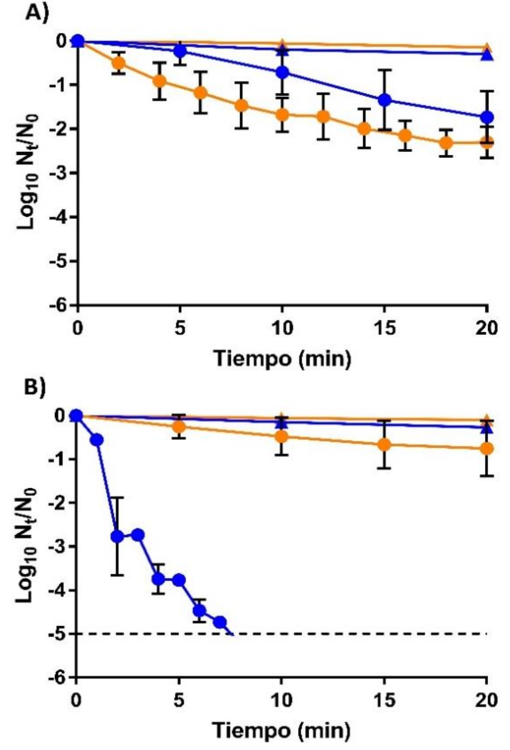


Figura 1: gráfica de supervivencia de *E. coli* (A) *y L. monocytogenes* (B) tras tratamientos de AE. *Thymus capitatus* (200 µL/L) en forma libre (●) y encapsulada (▲), a pH 4,0 (●) y pH 7,0 (●). La línea discontinua indica el límite de detección

Pese a los resultados obtenidos, los AE encapsulados revelaron una elevada actividad bactericida cuando se aplicaron a 53˚C (Fig. 2), igualando e incluso mejorando el efecto combinado observado con el AE sin encapsular. Así, tras un tratamiento combinado a pH 4 frente a *E. coli*, el AE encapsulado mostró una inactivación 2 ciclos log_{10} mayor que el AE libre (6-10 min) (Fig. 2A). Respecto a *L. monocytogenes*, no se observaron diferencias significativas (p>0,05) entre los tratamientos combinados del AE encapsulado y sin encapsular, a ninguno de los pHs testados (Fig. 2B).

Conclusiones

El empleo de zeínas, como método de encapsulación, ha demostrado afectar negativamente a las propiedades antimicrobianas del AE *Thymus capitatus* cuando se emplea como único método de conservación.

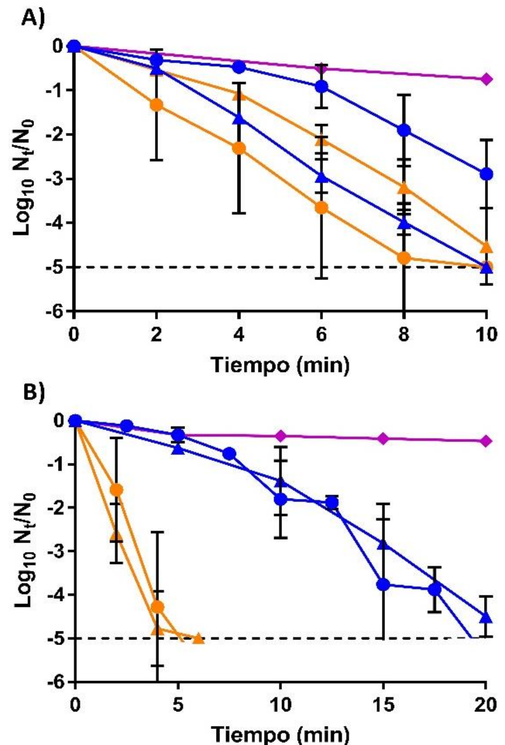


Figura 2: gráfica de supervivencia de *E. coli* (A) y *L. monocytogenes* (B) tras tratamientos combinados de calor (53˚C) y AE. *Thymus capitatus* (100 µL/L) en forma libre (●) y encapsulada (▲) a pH 4,0 (●) y pH 7,0 (●). La línea discontinua indica el límite de detección y la morada el efecto aditivo teórico (◆).

Sin embargo, los resultados en tratamientos combinados revelan que el uso de encapsulados con calor puede ser una interesante alternativa para la conservación de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha recibido el apoyo financiero de Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (AGL2015-69565-P), de FEDER, Fondo Social Europeo, Oficina Aragonesa de Ciencia, Tecnología e Investigación de la Universidad (A03-17R); del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (ayuda FPU a DB); y del Instituto Agroalimentario de Aragón.

REFERENCIAS

[1] E.L. de Souza et al. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, **2016**, *15*(4), 753-772.
[2] B. Prakash et al. *Food Control*, **2018**, *89*, 1-11.

EL FACTOR σ^B CONTROLA EL DESARROLLO DE LA TERMORRESISTENCIA DEPENDIENTE DE LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Nadal, L., Mañas, P., Cebrián, G.

Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet, 177. 50013, Zaragoza (España).

guiceb@unizar.es

Los tratamientos térmicos son ampliamente utilizados por la industria alimentaria para lograr la inactivación de los microorganismos contaminantes. Pese a su gran utilidad, a día de hoy todavía no se conoce con precisión el modo de acción del calor sobre las células microbianas. Así, entre los factores que más influyen en la termorresistencia bacteriana se encuentran la temperatura y la fase de crecimiento de las células, factores que podrían actuar a través de diversos mecanismos como la modulación de la fluidez de la membrana citoplasmática celular y la inducción de la síntesis de proteínas del choque térmico (HSPs) [1]. Dado que el factor sigma σ^B de fase estacionaria controla muchos de los cambios fisiológicos y estructurales que acontecen en las células bacterianas como consecuencia de la entrada en fase estacionaria, entre ellos la síntesis de determinadas HSPs [2] resulta razonable pensar que dicho factor sigma σ^B (o, mejor dicho, los cambios en su nivel de expresión) podría ser el responsable del aumento en resistencia al calor que las células de *S. aureus* experimentan conforme se eleva su temperatura de crecimiento.

Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue determinar si el incremento en la termo-resistencia de las células de *Staphylococcus aureus* que se observa como consecuencia del incremento en la temperatura de crecimiento está controlado por el factor sigma de fase estacionaria, σ^B.

Para llevar a cabo este trabajo se utilizaron las cepas *S. aureus* Newman y *S. aureus* IK84 (mutante isogénico de la cepa Newman sin el operón *sigB*). Las suspensiones de ambas cepas se obtuvieron tras inocular botes de 50 ml de caldo TSB + 0,6 de extracto de levadura (Biolife, Milan, Italia) que se incubaron durante diferentes tiempos y a diferentes temperaturas (10 a 42 ºC). Las determinaciones de resistencia al calor (52-62 ºC) se llevaron a cabo en un Termorresistómetro TR-SC como se ha descrito previamente [3] y utilizando como medio de recuperación agar TSA + EL 0,6 % (Biolife) Las gráficas de supervivencia obtenidas se modelizaron con la herramienta GInaFiT (KU Leuven, Leuven, Bélgica).

La figura 1 muestra la influencia del tiempo de incubación en la resistencia al calor (D_{54}; calculado a partir de la inversa del valor k del modelo de Geeraerd) de las células de *S. aureus* Newman obtenidas a diferentes temepraturas de crecimiento. Como se puede observar la resistencia de las células en fase exponencial de crecimiento fue similar para cada una de las temperaturas de crecimiento independientemente del tiempo de incubación de las mismas. Sin embargo, tras la entrada en fase estacionaria la termorresistencia de todas las suspensiones se incrementó, aunque la magnitud de este incremento fue mayor para las células crecidas a mayores temperaturas de crecimiento.

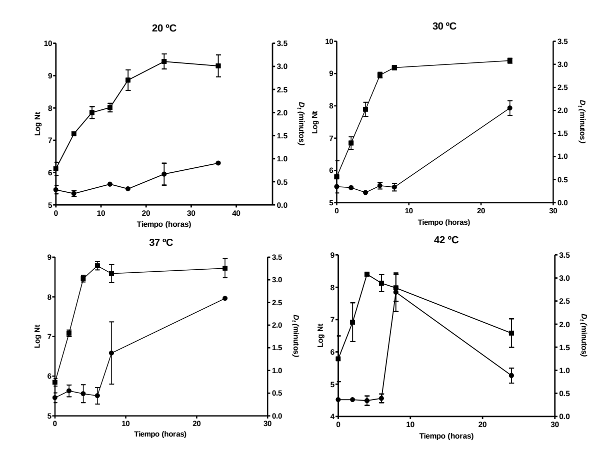


Figura 1: Influencia del tiempo de incubación en la termorresistencia de las células de *S. aureus* Newman crecidas a diferentes temperaturas. En la figura se muestran el parámetro D_{54} (●) y Log N_0 (■).

Estos resultados sugerían que dado que las diferencias en termorresistencia sólo se observaban en fase estacionaria de crecimiento el factor σ^B podría ser el que controlara dicho fenómeno. Para comprobar dicha hipótesis se determinó la termorresistencia de las células de la cepa IK84 (mutante isogénico de la cepa Newman sin el operón *sigB*) obtenidas a diferentes temperaturas y en fase exponencial y estacionaria de crecimiento y se comparó con la de la cepa parental.

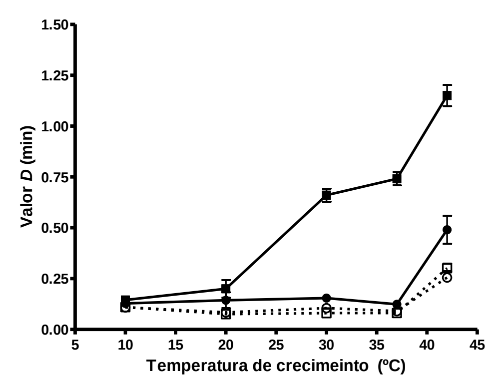


Figura 2: Valores D_{58} calculados para *S. aureus* Newman (■, □) y *S. aureus* IK84 (●, ○) en fase estacionaria (símbolos rellenos) y exponencial de crecimiento (símbolos huecos).

Como puede observarse en la figura 2 un incremento en la temperatura de crecimiento de las células de la cepa Newman condujo a un incremento en termo-resistencia, aunque este fenómeno sólo se observa en las células en fase estacionaria de crecimiento (salvo para las crecidas crecidas a 42 ºC). Por su parte, en la cepa IK84 no se observó este incremento de termo-resistencia, salvo, de nuevo, en las crecidas a 42 ºC.

Por otra parte, no se observaron diferencias estadisticamente significativas entre los valores z calculados (tabla 1) por lo que se puede concluir que las diferencias de resistencia observadas se mantendrían constantes en todo el rango de temperaturas de tratamiento estudiado.

Tabla1: Valores *z* calculados.

Temperatura de crecimiento	*S. aureus* Newman		*S. aureus* IK84	
	z	S.D.	*z*	S.D.
FASE ESTACIONARIA				
10 ºC	5,167	0,473	4,982	0,716
20 ºC	4,659	0,670	4,979	0,534
30 ºC	4,772	0,622	5,235	0,579
37 ºC	5,150	0,354	5,470	0,355
42 ºC	4,913	0,540	4,478	0,328
FASE EXPONENCIAL				
10 ºC	4,953	0,363	N.D.	-
20 ºC	4,914	0,178	N.D.	-
30 ºC	4,615	0,352	N.D.	-
37 ºC	4,944	0,427	N.D.	-
42 ºC	4,511	0,369	N.D.	-

N.D. No determinado

Los resultados obtenidos demuestran que el factor σ^B controla el desarrollo de termo-resistencia que se produce como consecuencia del incremento en la temperatura de crecimiento en *S. aureus*. También indican que *S. aureus* posee mecanismos alternativos de desarrollo de termorresistencia que se activarían por encima de 37 ºC.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Zaragoza y la Fundación Ibercaja (Proyecto IUZ-2017-CIE-01).

REFERENCIAS

[1] G. Cebrián, S. Condón y P. Mañas, *Foods*, **2017**, *6* (12), 107.

[2] J. Pané-Farré, B. Jonas, K. Förstner, S. Engelmann y M. Hecker, *Int. J. Med. Microbiol.*, **2006**, *296* (4-5), 237-258.

[3] S. Condón, J.M. Arrizubieta y F.J. Sala. *J. Microbiol. Meth.* **1993**, *18* (4), 357-366.

PLASMA TECHNOLOGY AS AN ALTERNATIVE TO EXTEND SHELF-LIFE OF FRESH MEAT

Oliveira M., Ojha S., Tiwari B.K.
Teagasc Food Research Centre, Food Chemistry and Technology, Ashtown, Dublin D15KN3K, Ireland
marcia.oliveira@teagasc.ie

One of the main challenges in the food production is to improve competitiveness by identifying innovations which comply with safety policies and guarantee food safety, while at the same time meeting consumer demands for safe and nutritious foods. Non-thermal technologies have shown potential to address the demands of the consumer and deliver high-quality, safe and nutritious processed foods with an extended shelf-life. Fresh meat is highly perishable and has a limited shelf-life because of microbial and enzymatic spoilage. Application of novel technologies including plasma technology has been demonstrated effectiveness against a wide range of pathogenic microorganisms thus improving safety without affecting the overall product quality. This study investigated the application of plasma activated-water (PAW) generated by employing Cold-Jet and Microwave (MW) technology on fresh meat. Total viable counts and quality parameters were monitored. No significant reductions in TVC on meat were observed at the treatment conditions. However, >3.0 log reductions were observed in wash water generated by MW PAW. The combination with other technologies may be required to improve the PAW application on fresh meat.

Current decontamination technologies for fresh meat are based on either chemicals or heat. Hot water is used throughout in the industry on warm carcasses and can be combined with chemical solutions such as organic acids. The main challenges related to fresh food decontamination are driven by the incresing awareness of consumers against chemical additives in food and the negative impact of high temperature on the nutritional and sensory qualities of food. Thus, the meat industry is increasingly interested in the development and implementation of new processing technologies.

Plasma technology has shown significant potential for meat processing applications. Plasmas are recognised as the fourth state of matter and result from applying energy (heat, voltage or light) to a gas, initiating a breakdown of individual gas molecules into free electrons, ions and metastable species. A relatively new approach for the delivery of plasma-generated species to biological targets is to 'activate' water or other liquids through exposure to plasma discharges. This results in plasma-activated water (PAW), which can be used as an active washing agent. Such an approach is advantageous for its easy application, defined dose, storability and off-site generation. PAW displays, for a period of time, reactive properties which may be used for either disinfection of the water itself or as a wash agent for surfaces.

The main objective of the present study was to evaluate the application of PAW on fresh meat and the combination with Ultrasound (US). Total viable counts (TVC) on meat samples and in water were monitored along with selected meat quality parameters.

Preliminary studies with Cold-Jet PAW were carried out in *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Pseudomonas* spp. suspension solution. Bacteria culture suspensions were exposed to PAW (20kV, 30kV and 40kV) and samples were taken after 0, 30 min, 1h, 3h, 5h and 24h.

For meat studies, PAW, US, PAW+US treatments and control were carried out as shown in Fig. 1.

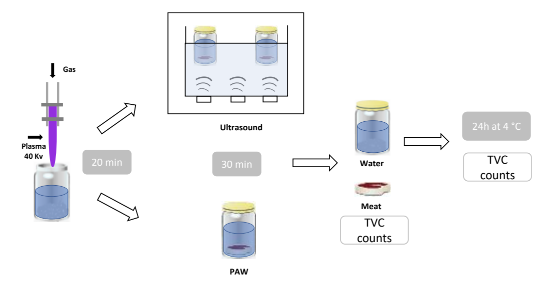


Figure 1. Schematic diagram of the methodology.

Meat samples (10 g) were homogenised with 90 mL of sterile Buffered Peptone Water (BPW) for 90 s. For each meat and water sample, appropriate serial decimal dilutions were prepared in BPW for TVC determined on Plate Count Agar medium (PCA) and incubated at 30 °C for 72 h.

The colour parameters on meat: lightness (*L**), redness (*a**), yellowness (*b**) and total colour difference (TCD) which indicates the magnitude of colour change after treatment were measured according by Torres et al.[1] Measurement of reactive species (e.g. H_2O_2, NO_3^- and NO_2^-) were carried out immediately after the plasma treatments[2].

Table 1. Colour parameters: lightness (*L**), redness (*a**), yellowness (*b**) in fresh meat subjected to different processing treatments.

T	*Plasma system*	*L**	*a**	*b**	*TCD*
CK	MW	45.5 ± 6.1	7.7 ± 2.5	9.1 ± 2.5	0
	JET	45.5 ± 2.4	9.8 ± 1.6	10.1 ± 1.2	0
US	-	43.3 ± 2.9	6.9 ± 1.4	8.0 ± 1.2	4.9 ± 2.5
PAW	MW	43.4 ± 5.0	3.9 ± 1.0	6.5 ± 1.8	6.8 ± 2.6
	JET	44.7 ± 4.7	6.5 ± 0.8	7.6 ± 1.9	6.1 ± 2.2
PAW + US	MW	45.2 ± 4.7	6.9 ± 2.2	8.0 ± 2.9	5.0 ± 3.0
	JET	50.2 ± 5.6	5.6 ± 1.2	8.8 ± 1.5	7.3 ± 4.6

Colour changes of meat in the different treatments are shown in Table 1. MW plasma treatment reduced the lightness of the meat (*L**). Loss of redness (*a**) was observed for samples treated with both plasma systems and the yellowness (*b**) decreased in treated samples. The combination of PAW+US generated by Cold-jet obtained the highest colour change. H_2O_2, as a major long-lived species, was examined in PAW and the concentration after plasma treatment was higher when generated by Cold-Jet plasma (Fig. 2). There was no significant difference among nitrates and nitrites concentrations for both PAWs.

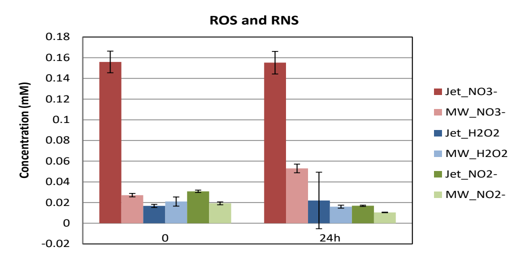


Figure 2. H_2O_2, NO_3^- and NO_2 concentration in PAW in diffentent plasma treatments over storage for 24h at 4 °C in a sealed container.

Pseudomonas spp. was the most senstive bacteria, showing completely inactivation after 30 min in PAW 30kV. *S. aureus* presented more resistance to PAW with 1.0 log reduction after 1h treatment at 40kV (data not shown).

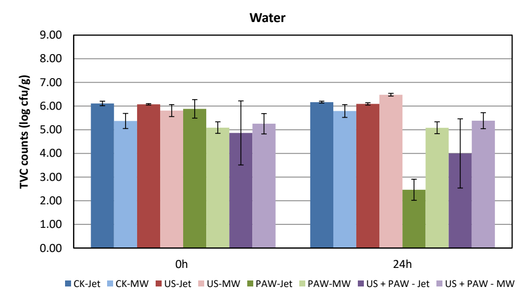


Figure 3. TVC counts in water after treatment and over storage for 24h at 4 °C in a sealed container.

After PAW treatments assayed in this study, no effect on TVC on fresh meat was observed (data not shown). However, TVC reductions (>3.0 log) were observed in water generated by MW PAW after 24h (Fig. 3).

These results showed that PAW could avoid cross contamination in wash water but more studies are needed to evaluate the efficacy of PAW on fresh meat.

REFERENCES

[1] B. Torres, et al. *Food Chem,* **2011,** *124, 721–726.*

[2] P. Lu, et al. *Plasma Process Polym*, **2017**, *14, e1600207*.

CLONAJE Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMA LACASA DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* ENOLAB 4816

Olmeda I.[1], Callejón S.[1], Sendra R.[2], Ferrer S.[1], Pardo I.[1]
Universitat de València Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia
1 ENOLAB, ERI BioTecMed
2 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Isabel.Pardo@uv.es

Introducción

Aunque hasta la fecha se ha descrito la presencia de genes de lacasa en muchos procariotas, muy pocas de estas enzimas se han aislado y caracterizado [1].

Callejón *et al.* [2] describieron en 2014 la presencia de enzimas lacasas en algunas cepas de bacterias lácticas responsables de la degradación de aminas biógenas (AB). Las AB son compuestos tóxicos presentes en muchos alimentos fermentados. *Pediococcus pentosaceus* es una bacteria láctica asociada a procesos de producción de alimentos y bebidas fermentadas [3]. Fruto de la búsqueda de actividades lacasa en bacterias Gram+ del entorno alimentario, nuestro grupo descubrió que varias cepas de *P. pentosaceus* poseían actividad lacasa. De entre ellas se eligió la cepa ENOLAB 4816, procedente de vino, por poseer alta actividad lacasa. El objetivo de este trabajo fue el clonaje del gen de la enzima lacasa de la cepa *P. pentosaceus* ENOLAB 4816, y la caracterización bioquímica de la enzima correspondiente.

Material y Métodos

Clonaje y expresión de LacaPepe4816. El gen de la lacasa LacaPepe4816 de *P. pentosaceus* ENOLAB 4816 se clonó en el plásmido de expresión pET28a (que contenía una secuencia codificante para una cola de polihistidinas) y se transformó en células de *E. coli* BL21 (DE3) que poseían previamente el plásmido pGrO7 (el cual codifica para una chaperona que asiste al correcto plegamiento de las proteínas). La expresión se indujo a una $D.O._{600\ nm}$ de 0.6 siguiendo el protocolo descrito por Callejón *et al.* [4, 5] añadiendo 1 mM de IPTG a 2 L de Terrific Broth (TB) suplementado con 0.5 mg/L arabinosa, 0.2 mM de $CuCl_2$, 50 µg/mL de kanamicina y 20 µg/mL de cloranfenicol. Las células recogidas por centrifugación a 10000 rpm durante 20 min, se resuspendieron en tampón de lisis (1 mM PMSF, 10 µg/mL RNAsa, 1 mg/mL lisozima, DNAsa 5 µg/ml y $MgCl_2$ 1 mM y el cóctel de inhibidores de proteasas Complete (Roche)), y se rompieron con perlas de vidrio de 106 µm [4, 5]. El extracto libre de células se dializó frente a un tampón fosfato sódico 50 mM pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol y 0'05 % de Tween 20. La purificación de la proteína se realizó mediante cromatografía de afinidad (Ni-NTA) que retiene proteínas con colas de polihistidina. La proteína unida a la columna se eluyó con el mismo tampón pero que contenía 250 mM de imidazol. Posteriormente, se realizó otra diálisis frente a tampón fosfato sódico 50 mM pH 7'4 que contenía 0'05 % Tween 20 para eliminar el imidazol [4, 5].

Caracterización bioquímica. Según Callejón *et al.* [4, 5] se determinaron el espectro de absorción, la masa molecular, las Km y Vmáx para los sustrato ABTS y DMP. Los ensayos para establecer el efecto de la temperatura, la termoestabilidad, y el efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad enzimática se realizaron en un ensayo líquido en microplaca (Tabla 1), tomando diferentes volúmenes de la enzima purificada diluida 1:50 en un volumen final de 200 µL de tampón acetato 50 mM que contenía 2 mM ABTS y 0,1 mM de $CuSO_4$ durante 3 minutos; luego se

detuvo la reacción con 1 mM de azida sódica y se midió la $\Delta Abs_{420\ nm}$.
Para determinar el efecto del pH se usó el tampón citrato-fosfato (pH 2,5-8). En el caso del estudio de los inhibidores, la enzima se incubó con cada uno de ellos a una concentración de 0'1 mM y 1 mM durante 10 min, tiempo tras el cual se añadió el sustrato y se procedió como en los casos anteriores.

Ensayos de degradación de AB. Se ensayó la capacidad de degradación de la tiramina usando 2 µL de la enzima diluida 1/10 en un volumen final de 100 µL de tampón acetato 50 mM que contenía 150 mg/L de AB (tiramina, histamina o putrescina) 2 mM ABTS y 100 µM de $CuSO_4$. Las AB se cuantificaron por LC-FLD [4].

Resultados y Discusión

Se obtuvo una concentración de proteína purificada de 18'28 mg/mL. El espectro de absorción UV-visible mostró una banda ancha a 575-600 nm, con un pico a 590 nm. El tamaño de la enzima fue ~64 kDa (Figura 1).

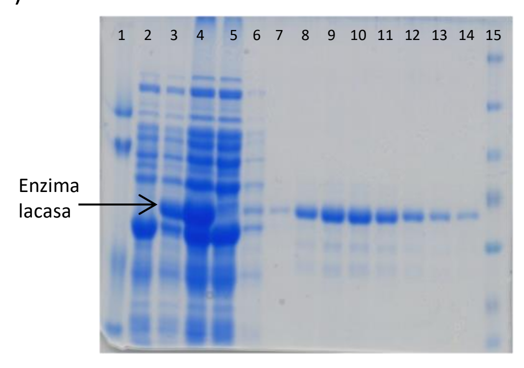


Figura 1: Gel 8% SDS-PAGE. Carrera 1: Pierce prestained protein marker (Thermo). 2: Control no inducido. 3: Control inducido. 4: Extracto aplicado a la columna. 5: Fracción de proteínas no retenidas en la columna. 6: Fracción de lavado de la columna. 7- 14: Fracciones eluídas durante la purificación, 15: LMW marker (Amersham).

Los valores de Km para el ABTS y el DMP fueron de 2.38 mM y 5.72 mM, respectivamente, y las Vmáx obtenidas fueron de 5,13 U/mg para el ABTS y 0.017 U/mg para el DMP.
Los valores de pH y temperatura óptimos para el ABTS fueron de 3 y 55°C, respectivamente. Respecto a la termoestabilidad, la proteína retenía al menos el 100% de su actividad después de 5 minutos de incubación a 75°C.
Los inhibidores más activos a 0.1 mM fueron la azida sódica y cisteína (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de la adición de inhibidores sobre la actividad enzimática de la lacasa de *P. pentosaceus* ENOLAB 4816 frente al ABTS.

	% Inhibición	
Inhibidor	**0.1 mM**	**1 mM**
Ácido tioglicólico	0	98
Azida sódica	75	79
Ditiotreitol	14	98
Cisteina	39	100
$CoCl_2$	0	9
$ZnCl_2$	0	0
EDTA	0	10

Ensayos de degradación de AB. El enzima fue capaz de degradar el 60% de la tiramina presente en el ensayo, pero no la histamina ni la putrescina.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por AGL2015-71227-R, FEDER, Ministerio de Economía y Competitividad.

REFERENCIAS

[1] Martins L. O., Durão P., Brissos V., Lindley P. F. *Cell.Molr Life Sci.* **2015**, *72*: 911-922
[2] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I., *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **2014**, *98:* 185-198
[3] Yongjin H., Wenshui X., Changrong G. World J. Microbiol. Biotechnol., **2007,** 23: 1021-1031
[4] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2016**, *100:* 3113-24.
[5] Callejón S, Sendra R, Ferrer S, Pardo I. *PlosOne*, **2017**,*12:* e0186019

EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA DEL JAMÓN CURADO EN LA INACTIVACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* POR ALTAS PRESIONES

Pérez-Baltar A., Montiel R., Medina M.
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)/ Tecnología de Alimentos. Carretera de La Coruña Km 7,5, 28040 Madrid.
perez.aida@inia.es

Introducción
El jamón curado es considerado generalmente un alimento seguro desde el punto de vista microbiológico por características tales como su baja actividad de agua (a_w) y la presencia de conservantes. No obstante, durante su deshuesado y/o loncheado puede contaminarse por patógenos alimentarios. *Listeria monocytogenes* es una bacteria ampliamente distribuida en el ambiente de las industrias agroalimentarias [1], capaz de formar biofilms y sobrevivir a condiciones de estrés [2]. Causa listeriosis, la enfermedad asociada a alimentos que más muertes ocasiona en la población de riesgo en países desarrollados. Las altas presiones hidrostáticas (APH) se emplean en la industria cárnica para mejorar la seguridad alimentaria y aumentar la vida útil de los productos. Su efectividad depende de la intensidad y la duración del tratamiento, así como de las características físico-químicas de la matriz alimentaria [3]. En este contexto, ha sido descrito que la baja a_w ejerce un efecto baroprotector sobre *L. monocytogenes*[4]. Así, el objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de las APH en la inactivación de *L. monocytogenes* en jamón curado de distinta a_w y almacenado durante 30 d a 4 °C.

Materiales y Métodos
Se contaminaron artificial e individualmente lonchas de jamón curado con cuatro cepas de *L. monocytogenes* de la colección del INIA (S2, S4-2, S7-2 y S12-1) y con una cepa conocida causante de listeriosis (Scott-A) y se sometieron a tratamientos de APH de 400, 500 y 600 MPa durante 5 min. Tras 24 h, se realizaron recuentos en CHROMagar *Listeria* con el fin de seleccionar las cepas en función de su sensibilidad a los tratamientos.

Para realizar el ensayo de baroprotección, se partió de lonchas de jamón curado de unos 20 g con una a_w de 0,92, que se modificó con sales saturadas hasta valores de 0,88, 0,84 y 0,80. Las lonchas se contaminaron individualmente con dos cepas de *L. monocytogenes* de distinta sensibilidad a las APH a niveles de aproximadamente 10^6 ufc/g, se envasaron a vacío y se mantuvieron a 4 °C para favorecer la adsorción del patógeno al músculo. Se aplicaron tratamientos de 450 MPa durante 10 min y de 600 MPa durante 5 min a una temperatura aproximada de 11°C. Las muestras se almacenaron a 4 °C y los recuentos del patógeno se realizaron en placas de CHROMagar *Listeria* a las 24 h y a los 15 y 30 d. El ensayo se realizó por duplicado.

Resultados
Con el fin de ensayar el posible efecto baroprotector de la baja a_w sobre *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado, en primer lugar se comprobó la diferente sensibilidad de cinco cepas *de L. monocytogenes* frente a los tratamientos de APH en jamón curado (Figura 1).

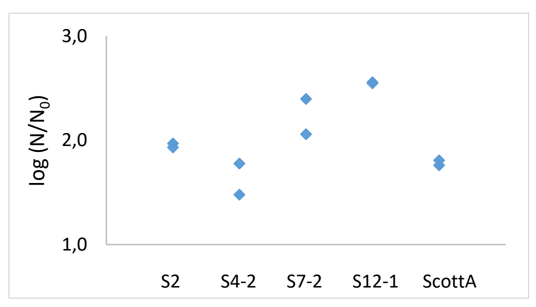


Figura 1: Inactivación de distintas cepas de *L. monocytogenes* en jamón curado mediante un tratamiento de AHP de 600 MPa durante 5 min.

Se seleccionaron las cepas S4-2, de serotipo 1/2b, y S12-1, de serotipo 1/2c, por ser la más resistente y la más sensible a un tratamiento de APH de 600 MPa durante 5 min, respectivamente.

La aplicación de APH en jamón curado de distinta a_w redujo los recuentos de *L. monocytogenes*, observándose diferencias entre las dos cepas ensayadas y entre los diferentes valores de a_w (Figura 2).

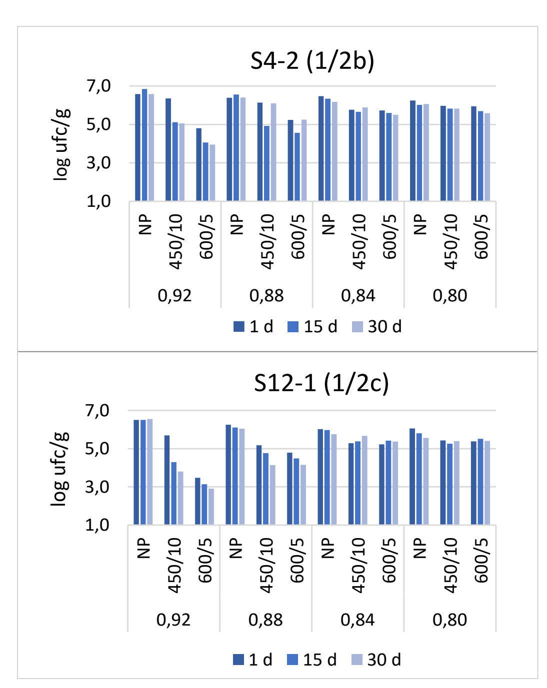


Figura 2: Recuentos de *L. monocytogenes* S4-2 y S12-1 (log ufc/g) en jamón curado loncheado con distintas a_w (0,92, 0,88, 0,84 o 0,80) sometido a tratamientos de APH (450 MPa/10 min o 600 MPa/5 min) durante 30 d a 4 °C.

Los recuentos iniciales de *L. monocytogenes* S4-2 y S12-1 en el jamón curado control fueron 6,6 y 6,5 log ufc/g, respectivamente, y no resultaron alterados por la modificación de la a_w durante los 30 d de refrigeración a 4 °C. A las 24 h, la aplicación de 450 MPa durante 10 min en jamón curado con una a_w de 0,92 disminuyó los recuentos de S4-2 y S12-1 0,2 y 0,8 unidades logarítmicas, respectivamente, mientras que el tratamiento de 600 MPa durante 5 min dio lugar a reducciones mayores, de 1,8 log ufc/g para la cepa más resistente S4-2 y de 3,0 log ufc/g, para la cepa más sensible S12-1. La disminución de la a_w en el jamón curado loncheado ejerció un efecto baroprotector sobre las dos cepas. Así, la aplicación de 600 MPa/5 min en jamón curado con una a_w de 0,80 redujo los recuentos de *L. monocytogenes* S4-2 y S12-1 en 0,3 y 0,7 unidades logarítmicas, respectivamente. La reducción alcanzada por este tratamiento fue 1,5 y 2,3 unidades inferiores a las registradas en jamón curado con a_w de 0,92. Durante la refrigeración a 4 °C se registró un mayor descenso en los niveles del patógeno en las muestras tratadas y con a_w más elevadas.

Conclusión

La mayor inactivación de *L. monocytogenes* en jamón curado sometido a distintos tratamientos de APH se registró en las muestras con mayor a_w, confirmándose así el efecto baroprotector que la baja a_w ejerce sobre *L. monocytogenes* en las dos cepas ensayadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido financiación del proyecto RTA2013-00070-C03-01 (MINECO).

REFERENCIAS

[1] V Ferreira, M Wiedmann, P Teixeira, MJ Stasiewicz, *J Food Prot*, **2014**, *77*, 150-170.

[2] BH Lado, AE Yousef, (2007), "*Listeria*, listeriosis and food safety" (ET Ryser and EH Marth, 2007).

[3] S Bover-Cid, N Belletti, T Aymerich, M Garriga, *Meat Sci*, **2017**, *123*, 120-125.

[4] MF Patterson, *J Appl Microbiol*, **2005**, *98*, 1400–1409.

EFFECTIVENESS OF BACTERIOPHAGE P100 AS A BIOCONTROL AGENT AGAINST *Listeria monocytogenes* BIOFILMS

Rodríguez-Melcón C.[1, 2], Riesco-Peláez F.[3], Capita R.[1, 2], Alonso-Calleja C.[1, 2]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España.

2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León. Calle La Serna, nº 58, 24007-León, España.

3 Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Sistemas y Automática, Escuela de Ingenierías Industrial, Informática y Aeroespacial, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España.

carlos.alonso.calleja@unileon.es

Introduction

In 2016, listeriosis was the fifth commonest zoonotic infection in the EU, with 2,536 invasive cases of human disease. The EU notification rate was 0.47 cases per 100,000 population, which was an increase of 9.3% compared with 2015 [1]. Even through listeriosis occurs infrequently, it is one of the most important food-borne disease because of its high case-fatality rate, which can exceed 30%.

L. monocytogenes has the ability to attach to, and develop biofilms on, most of the surfaces used in food processing facilities. Biofilms are the principal feature facilitating this pathogen's environmental spread and thus may become potential sources of food contamination. The effect of bacteriophage P100 on the structural parameters of 24-hour-old biofilms formed on polystyrene by a *L. monocytogenes* strain of food origin belonging to serotype 1/2a (LM) was evaluated through confocal laser scanning microscopy (CLSM) and digital image analysis. These data may contribute to the future development of potential phage-mediated biofilm control approaches.

Material and methods

The commercial bacteriophage preparation Listex™ P100 (phage P100) was obtained from Micreos Food Safety (Wageningen, The Netherlands) at concentrations of 10^{11} PFU/mL. Decimal dilutions (from 10^{0} PFU/mL to 10^{11} PFU/mL) were prepared in phosphate buffer saline immediately before using. An analysis of the structure of the biofilm was undertaken using the method previously developed [2]. Phage suspensions were applied to 24-hour-old biofilms for a further 24 hours, and Texas Red®-X dye–labeled WGA (ViaGram™ Red^{+} Bacterial Gram Stain and Viability Kit; Invitrogen, Carlsbad, California) at 1 µl/mL was used for biofilm staining.

Confocal laser Scanning Microscopy (CLSM) image acquisition was performed using a Nikon Eclipse TE 2000-U confocal laser scanning microscope with EZ-C13.60 software (Nikon Instruments Inc., New York). Three stacks of horizontal plane images (512 × 512 pixels corresponding to 119 µm × 119 µm) with a z-step of 1 µm, were acquired for each biofilm from three different areas (three independent experiments were performed on different days). Three-dimensional projections of the structure of the biofilms were reconstructed using the IMARIS 9.1 software package (Bitplane, Zurich, Switzerland). The quantitative structural parameters of the biofilms were calculated using the BioRCA 1.7 software, developed by members of the Research Group using

the *Lazarus* Integrated Development Environment (IDE).

Results and Discussion

LM produced compact structures at 24 hours of incubation, with a biovolume in the observation field (14,121 µm^2) of 237,333.14 ± 2,692.63 µm^3, covering most of the surface available (99.89 ± 0.09%). The roughness of the LM biofilms was 0.156 ± 0.052, their maximum thickness was 27.00 ± 1.00 µm and their average thickness 16.76 ± 0.19 µm.

Exposure to bacteriophage P100 resulted in a decreased amount of biomass, significant when concentrations were equal to or greater than 10^2 PFU/Ml. Biomass reduction relative to control biofilms after Listex^{TM} P100 treatment ranged from 2.60% (in biofilms treated with 10^0 PFU/mL) to 99.91% (10^{11} PFU/mL). Phage concentration significantly ($P < 0.05$) influenced biovolume of LM biofilms between 10^0 and 10^8 PFU/mL. On the other hand, concentrations of 8, 9, 10 and 11 log PFU/mL produced similar ($P > 0.05$) biofilm removal. Thus, for optimal efficacy, the phage P100 concentration must not be less than 8 log PFU/mL. The set critical limit of 8 log PFU per mL or g or cm^2 has been reported for effective antilisterial treatment both of biofilms [3] and of foodstuffs [4].

An inverse correlation was observed between phage concentration (log units) and the biovolume of biofilms (-0.965; $P < 0.001$). The concentrations (log units) of bacteriophage P100 also showed a significant ($P < 0.001$) inverse relationship with surface coverage (r= -0.939), maximum thickness (r= -0.853) and average thickness (r= -0.965). Phage concentration correlated positively ($P < 0.001$) with roughness (r= 0.976); a positive change in the roughness coefficient indicates an increase in biofilm heterogeneity. Thus, as the phage concentration increased, CLSM biofilm images transformed from compact flat structures to irregularly shaped micro-colonies. Only a limited number of bacterial cells forming a few small clusters were observed in biofilms treated with 8 to 11 log PFU/mL.

It would appear that this is the first study to use CLSM and digital image analysis to explore the effects of the lytic, broad-host-range bacteriophage P100 (Listex^{TM} P100) at different concentrations on the structural parameters of biofilms previously formed by *L. monocytogenes*. This research reveals the potential of this phage preparation as an effective alternative strategy for *L. monocytogenes* biofilm control and eradication, with optimal results at concentrations equal to or greater than 8 log PFU/mL. Even though further experiments are needed under more realistic conditions (including mixtures of bacteriophages on biofilms composed of mixed strains of *L. monocytogenes*), the data from this study may help in the designing of useful phage-based disinfection methods in the food industry.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA, RTA2014-00045-C03-02), and the Universidad de León (Ayudas Puente Formativas).

REFERENCES

[1] EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.*, **2017**, *15*(12), 5077, 228 pp.

[2] R. Capita, F. Riesco-Peláez, A. Alonso-Hernando, C. Alonso-Calleja. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2014**, *80*(4), 1268-1280.

[3] V.Y. Montáñez-Izquierdo, D.I. Salas-Vázquez, and J.J. Rodríguez-Jérez. *Food Control*, **2012**, *23*(2), 470-477.

[4] L. Iacumin, M. Manzano, G. Comi. *Microorganisms,* **2016**, *4*(1), 4.

STRUCTURAL PARAMETERS OF THE BIOFILMS FORMED BY THREE GRAM-POSITIVE PATHOGENIC BACTERIA DURING BIOFILM DEVELOPMENT ON DIFFERENT CONTACT SURFACES

Rodríguez-Melcón, C.[1, 2], Riesco-Peláez, F.[3], Alonso-Calleja, C.[1, 2], Capita, R.[1, 2]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España.

2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León. Calle La Serna, nº 58, 24007-León, España.

3 Departamento de Ingeniería Eléctrica y de Sistemas y Automática, Escuela de Ingenierías Industrial, Informática y Aeroespacial, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España.

rosa.capita@unileon.es

Introduction

Listeria monocytogenes (LM), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) are recognized as major, globally occurring spread human pathogens. These bacteria are able to form biofilms on different abiotic surfaces [1, 2, 3]. In most reports, only a single surface material is studied, and limited data are available to compare the biofilm-forming ability of these bacteria on different contact surfaces, making it impossible to perform real comparisons between materials.

The objective of this study was to use observations under confocal laser scanning microscopy (CLSM) to compare the architecture and viability of biofilms formed by LM, MRSA and VRE (three strains of food origin were tested) on two contact surfaces (polystyrene and glass) after 24 hours and 72 hours of incubation at 37ºC. These materials were selected because they are widely used in the food industry and have different physicochemical characteristics, polystyrene being hydrophobic and glass hydrophilic.

Materials and Methods

An analysis of the formation and structure of the biofilm was undertaken on microtiter plates using the method previously described by Capita *et al.* [4]. SYTO9 (live cells) and propidium iodide (PI; dead cells) fluorescent dyes from the BacLight Viability Kit (Invitrogen) were used for biofilm staining. CLSM image acquisition was performed using a Nikon Eclipse TE 2000-U confocal laser scanning microscope equipped with EZ-C13.60 software (Nikon Instruments). The biofilms were observed with 40 × objective lens. Fluorescence was detected by excitation at 488 nm (argon laser), and emissions were collected with a 590/50 (SYTO9) or a 650LP (PI) bandpass filter.

Three stacks of horizontal plane images (512 × 512 pixels; 119 × 119 µm) with a z-step of 1 µm, were acquired for each biofilm from three different areas. Three independent experiments were performed for each condition on different days. Thus, 108 CLSM images were obtained. For image analysis, three-dimensional projections of the structure of the biofilms were reconstructed using the IMARIS 9.0 software package (Bitplane). The quantitative structural parameters and viability of the biofilms were calculated using the BioRCA 1.4 software, developed by some members of our Research Group using the *Lazarus* Integrated Development Environment (IDE) [2, 3].

Results and Discussion

Bacterial strains displayed a marked ability to form biofilms and formed dense and homogenous structures that covered the entire surface available. Biovolumes in the observation field (14,161 μm^2) of 180,804.50 ± 32,554.62 μm^3, 208,605.34 ± 57,534.93 μm^3 and 212,543.91 ± 39,718.62 μm^3 were found for LM, MRSA and VRE, respectively. Average values of 24.58 ± 3.98 µm, 99.95 ± 0.16%, and 0.15 ± 0.06 were observed for thickness, surface coverage and roughness, respectively.

Under the conditions described, LM, MRSA and VRE developed a robust biofilm with complex architecture after 24 hours of incubation (biovolumes ranged from 182,704.31 ± 16,368.36 μm^3 for LM on polystyrene to 238,200.56 ± 44,819.64 μm^3 for MRSA on polystyrene). Because biofilms increase the resistance of bacteria to antimicrobial agents and make their elimination difficult, results in this study suggest the need to sanitize food equipment and medical devices immediately after use to prevent biofilm formation. This is especially important for surfaces located at room temperature, as those tested in the study being presented here, where biofilm formation will probably to take place at a faster pace that at refrigeration temperature.

Biovolume of the biofilms formed by LM and MRSA on glass decreased ($P < 0.05$) after 72 hours of incubation. By contrast, similar biovolumes were observed at 24 hours and 72 hours for biofilms formed by LM and MRSA on polystyrene, and by VRE on polystyrene and glass. The cause of these differences remains to be characterized.

Percentages of dead or damaged (PI-stained) cells in biofilms ranged from 5.23 ± 3.74% (24 h, polystyrene) to 25.08 ± 2.22% (72 h, glass) for LM ($P < 0.001$), from 1.46 ± 1.15% (24 h, polystyrene) to 35.41 ± 7.39% (72 h, glass) for MRSA ($P < 0.001$), and from 3.02 ± 4.57% (72 h, polystyrene) to 4.54± 5.01% (72 h, glass) for VRE ($P > 0.05$). PI-stained cells showed an homogeneous distribution in the biofilm structures. Only a few dead or damaged cells were seen in 24-hours biofilms (between 1,842.7 ± 1,623.4 μm^3 and 15,202.6 ± 6,395.6 μm^3). After 72 hours of incubation, the three-dimensional reconstructions of biofilms formed by LM (glass and polystyrene) and MRSA (glass) showed an increase ($P < 0.05$) in the biovolume of PI-stained cells. These findings are congruent with previous observations for different bacterial species and are probably related to programmed cell death associated with the life-cycle of bacteria [5].

To sum up, LM, MRSA and VRE formed similar biofilms on glass and polystyrene. It should be highlighted there was rapid formation of compact biofilms by these strains. Hence, this work may provide further understanding of the process of biofilm formation by pathogenic bacteria, thus allowing optimization of strategies for controlling such microorganisms in the food industry and the medical system

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA, RTA2014-00045-C03-02), and the Universidad de León (Ayudas Puente Formativas).

REFERENCES

[1] E. Guerrero-Ramos, et al. *J. Food Prot.*, **2016**, *79*, 748-756.

[2] L. Buzón-Durán, et al. *Food Microbiol.*, **2017**, *65*, 294-301.

[3] R. Capita, et al. *Foodborne Pathog. Dis.*, **2017**, *14*, 350-356.

[4] R. Capita, et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2014**, *80*, 1268-1280.

[5] M. Mosquera-Fernández, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2016**, *236*, 130-137.

LA EXPOSICIÓN A DOSIS SUBINHIBITORIAS DE DESINFECTANTES PUEDE CONTRIBUIR AL INCREMENTO DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *Listeria monocytogenes*

Rodríguez-Melcón, C.[1,2], Alonso-Calleja, C.[1,2], Capita, R.[1,2]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España.

2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León. Calle La Serna, nº 58, 24007-León, España.

rosa.capita@unileon.es

Introducción

Listeria monocytogenes es uno de los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos. En el último informe de la EFSA, relativo al año 2016, se notificaron 1.524 casos confirmados de listeriosis humana y 247 muertes asociadas [1].

En las últimas décadas, el incremento de la resistencia a los antibióticos se ha convertido en una preocupación mundial, por lo que se han puesto en práctica diferentes medidas para controlar este problema. A pesar de ello, todavía se observa un aumento de la prevalencia de resistencia a múltiples antibióticos en diferentes grupos microbianos, incluyendo *L. monocytogenes*, bacteria conocida por tener una baja frecuencia de genes de resistencia [2, 3, 4].

Se ha sugerido que el uso de biocidas a dosis bajas en las industrias alimentarias (como consecuencia, por ejemplo, de un cálculo incorrecto de las concentraciones), podría favorecer la emergencia de resistencia a antibióticos [2, 5].

El objetivo de este estudio ha sido determinar el efecto de dosis subinhibitorias de cuatro biocidas de uso alimentario en la resistencia a antibióticos de una cepa de *L. monocytogenes* (serotipo 1/2a) de origen cárnico.

Materiales y métodos

Se utilizaron cuatro biocidas: hipoclorito sódico (HS, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), cloruro de benzalconio (CB, Sigma Aldrich), ácido peracético (AP, Sigma Aldrich) y fosfato trisódico (FTS, Merck, Darmstadt, Germany).

Los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMIs) se establecieron utilizando un método de microdilución en caldo de acuerdo con el CLSI (EE.UU.). Se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Para el cálculo de las CMIs, se consideró como límite de crecimiento una densidad óptica ($DO_{480-520}$) de 0,200 tras 48 h de incubación, realizándose las determinaciones en el equipo Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd.).

Para la adaptación de la cepa, los cultivos se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de los desinfectantes, comenzando por la mitad de la concentración mínima inhibitoria (CMI/2) y e incrementando 1,5 veces la concentración de biocida cada 24 horas hasta que dejó de observarse crecimiento.

Se determinó, antes y después de la exposición a los biocidas, la susceptibilidad de la cepa frente 9 antibióticos de importancia clínica (método de microdilución en caldo, CLSI): eritromicina,

clorafenicol, ampicilina, cefalotina, gentamicina, tetraciclina, vancomicina, cefoxitina y fosfomicina.

Resultados y Discusión

Los valores de las CMIs de los biocidas utilizados fueron 3.500 ppm (HS), 8 ppm (CB), 1.750 ppm (AP) y 20.000 ppm (FTS). Únicamente se logró la adaptación de la cepa al FTS, compuesto para el que, tras la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias, la CMI llegó a 56.953,12 ppm. Para el resto de los biocidas la CMI fue similar antes y después de la exposición a los compuestos.

Tras la exposición a los biocidas, se produjo una disminución de la susceptibilidad a la mayor parte de los antibióticos (Tabla 1), destacando la eritromicina, en cuyo caso la cepa fue susceptible antes de la exposición a los desinfectantes (CMI de 0,1 ppm), adquiriendo resistencia tras la exposición a CB (4 ppm), AP (1 ppm) y FTS (750 ppm). Algo similar ocurrió con la fosfomicina, pasando la cepa de susceptible (30 ppm) a resistente tras la exposición a todos los biocidas ensayados, observándose valores de CMI para el antibiótico de 180 ppm (tras exposición a HS), 240 ppm (CB), 190 ppm (AP) y 90 ppm (FTS).

Tabla 1: Concentraciones mínimas inhibitorias de 9 antibióticos frente a *L. monocytogenes*.

	Antibiótico (mg/L)								
	E	C	AMP	KF	CN	TE	VA	FOX	FOS
Límite de sensibilidad	1-1	8-8*	1-1	0.12-0.5**	1-1*	1-2*	2-2*	1-4**	32-32*
Cepa									
***L. monocytogenes* no expuesta**	0.1	26	30	190	15	14	38	40	30
***L. monocytogenes* expuesta a HS**	0.05	8	6	550	6	60	130	440	180
***L. monocytogenes* expuesta a CB**	4	8	4	650	60	2	40	1000	240
***L. monocytogenes* expuesta a AP**	1	6	0.5	190	30	7	4	900	190
***L. monocytogenes* expuesta (adaptada) a FTS**	750	8	40	130	20	20	40	300	90

E, eritromicina; C, clorafenicol; AMP, ampicilina; KF, cefalotina; CN, gentamicina; TE, tetraciclina; VA, vancomicina; FOX, cefoxitina; FOS, fosfomicina.
Datos recogidos de EUCAST, 2018 para *L. monocytogenes*.
*Datos recogidos en EUCAST, 2018 para *Staphylococcus aureus*.
** Datos recogidos en CLSI, 2018 para *S. aureus*.

Otros autores [4] han observado también diversos cambios en los patrones de resistencia a antibióticos después de la exposición a diferentes biocidas, pudiendo deberse este hecho a modificaciones en la expresión de bombas de expulsión inespecíficas o a cambios en la superficie celular [2, 5]. Hay que señalar que algunos investigadores han observado, coincidiendo con nuestro estudio, cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos con resistencia a la gentamicina [6].

Estos hallazgos sugieren que el empleo de biocidas a dosis subinhibitorias puede contribuir al aumento de la resistencia a antibióticos en cepas de *L. monocytogenes*.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA; RTA2014-00045-C03-02).

REFERENCIAS

[1] EFSA-ECDC –European Food Safety Authority-European Centre for Disease Prevention and Control-. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.*, **2017**, 15(12), 228 pp.

[2] R. Capita, C. Alonso-Calleja. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53*(1), 11-48.

[3] A. Alonso-Hernando, R. Capita, M. Prieto, C. Alonso-Calleja. *Food Control,* **2009**, *20*, 1108-1111.

[4] N. Komora, C. Bruschi, R. Magalhães, V. Ferreira, P. Teixeira. *Int. J. Food Microbiol.,* **2017**, *245*, 79-87.

[5] D. Molina-González, C. Alonso-Calleja, A. Alonso-Hernando, R. Capita. *Food Control,* **2014**, *40*, 329-324.

[6] M. Noll, S. Kleta, S. Al Dahouk. *J. Infect. Public Health*, **2018**, *11*(4), 572-577.

PASTEURIZACIÓN DE PINZAS DE BUEY DE MAR MEDIANTE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE (PEAV)

Sanz J.[1], Astráin L.[1], Martínez J.M.[1], Condón-Abanto, S.[1-2], Cebrián G.[1], Raso J.[1], Álvarez I.[1]
1 Universidad de Zaragoza/Ftad. Veterinaria-Instituto Agroalimentario de Aragón - IA2 (Universidad de Zaragoza-CITA)/Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de los alimentos. Miguel Servet 177. 50013. Zaragoza
2 UCD Institute of Food and Health, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland
nacho.alvarez@uizar.es

Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) se han utilizado tradicionalmente como una técnica de inactivación de microorganismos en alimentos líquidos a temperaturas inferiores a las utilizadas en los tratamientos térmicos [1]. Sin embargo, la posibilidad de aplicar PEAV de alta intensidad (E>1 kV/cm) a frecuencias elevadas (>10Hz) podría permitir utilizar esta técnica como un nuevo sistema de calentamiento rápido y volumétrico de alimentos sólidos, sustituyendo al tradicional calentamiento por convección/ conducción desde el medio calefactor hasta el interior del producto.

Aquí se evaluó el potencial de los PEAV como un nuevo sistema de calentamiento óhmico de alimentos sólidos, utilizando como ejemplo la pinza de buey de mar (*Cancer pagurus*), que permita aplicar tratamientos de pasteurización equivalentes en eficacia letal a los actualmente aplicados ($F_{90°C}$=10 min).

Varias conductividades eléctricas del medio (2,0 - 7,0 mS/cm) y anchuras de pulso (10 - 60 µs) fueron investigadas debido a la ausencia de datos sobre la influencia de estos parámetros en la velocidad de calentamiento. Las pinzas se sumergían en estas soluciones y se calentaban hasta un máximo de 95°C, aplicando pulsos de onda cuadrada de 0,1 kV/cm. Los pulsos fueron aplicados con el equipo Nutri-Pulse® E-Cooker NPB06 (IXL E-Cooker B.V., Schalkwijk, Países Bajos). La temperatura del medio y de las pinzas (en el centro y superficie) se registró con dos sondas tipo termopar del propio equipo.

La Fig. 1 muestra las curvas de evolución de la temperatura del interior de la pinza y del medio de calentamiento al aplicar PEAV en medios de distinta conductividad. Como se observa, a mayor conductividad del medio, más rápido se produjo el calentamiento, tanto del medio como de la pinza.

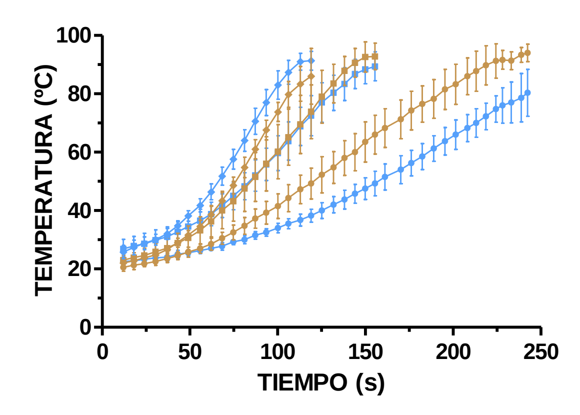


Fig. 1. Evolución de la temperatura del interior de pinzas de buey de mar (líneas marrones) y del medio de calentamiento (líneas azules) al aplicar tratamientos PEAV (0,1 kV/cm; 60 µs) en medios de 2,0 (●), 4,5 (■) y 7,0 mS/cm (◆).

Por otro lado, se observa que dependiendo de la relación entre la conductividad del medio y la de la pinza, la velocidad de calentamiento de uno respecto del otro varía. Así, a 2,0 mS/cm, la pinza se calentaba más rápidamente que el agua, mientras que a 7,0 mS/cm, era el medio el que incrementaba más rápidamente la temperatura. Para una conductividad de 4,5 mS/cm, la velocidad de calentamiento del medio y el producto fue la más uniforme, aspecto muy interesante para llevar a cabo tratamientos de

pasteurización. Por ello se utilizaron medios de conductividad 4,5 mS/cm para posteriores investigaciones.

La utilización de anchuras de pulso mayores produjo calentamientos más rápidos, si bien a 40 µs se alcanzaron velocidades similares a 60 µs (Figura 2), eligiéndose aquella anchura para posteriores estudios ya que también permitía calentamientos más uniformes en el interior de la pinza.

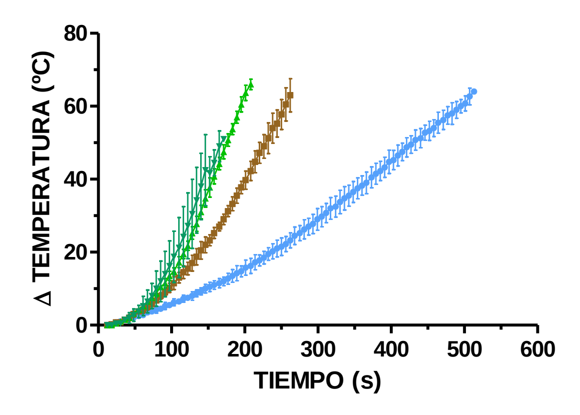


Fig. 2. Evolución de la temperatura del interior de pinzas de buey de mar al aplicar tratamientos PEAV (0,1 kV/cm; 4,5 mS/cm) con pulsos de 10 (●), 30 (■), 40 (▲) y 60 µs (▼).

En base a estos resultados, se obtuvieron las curvas de penetración de calor de pinzas aplicando tratamientos PEAV de 40 µs en medios de 4,5 mS/cm. A partir de estas curvas, se calcularon los tratamientos que serían necesarios para aplicar un $F_{90°C}$=10', recomendado por la FDA de los EE.UU. para reducir 6 Log_{10} de *Clostridium botulinum* Tipo E, referente en este tipo de productos (Figura 3). También se calcularon los tiempos necesarios para alcanzar dicho tratamiento, pero con un método de convección/conducción tradicional por inmersión en agua, en base a las curvas de penetración obtenidas. Dichos resultados se compararon con el fin de determinar si el calentamiento con PEAV supuso una reducción en el tiempo total de tratamiento necesario para aplicar el $F_{90ºC}$=10' a diferentes temperaturas (Tabla 1). Como se observa, los PEAV permitirían reducir entre un 10 y un 20% el tiempo de procesado en comparación con un tratamiento térmico convencional por inmersión en agua caliente. Los tratamientos a 90ºC de la Fig. 3 fueron validados utilizando *Bacillus mycoides*, microorganismo con una termorresistencia similar a *C. botulinum* Tipo E [2], obteniéndose similares niveles de inactivación entre los datos reales y los estimados con una variación en los recuentos obtenidos tras los tratamientos de menos de 0,5 Log_{10}.

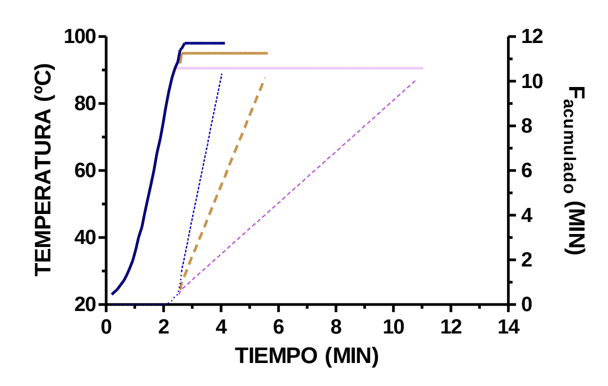


Fig. 3. Tratamientos tiempo/temperatura y F acumulado necesarios para aplicar un $F_{90°C}$=10' en pinzas de buey de mar con tratamientos PEAV (0,1 kV/cm; 4,5 mS/cm, 40 µs).

Tabla 1. Tiempos de procesado (min) para aplicar tratamientos equivalentes a un $F_{90°C}$=10' a distintas temperaturas mediante PEAV y un sistema de calentamiento tradicional en baño.

	PEAV	Tradicional	PEAV vs Tradicional	
F90ºC=10'	**Tiempo (')**	**Tiempo (')**	**Reducción (')**	**% reducción**
90ºC	11	12,9	1,9	14,7
95ºC	5,6	6,4	0,8	12
98ºC	4,1	5,2	1,1	20,8

Los resultados obtenidos indicarían que los PEAV pueden ser un tratamiento adecuado para aplicar tratamientos térmicos en productos sólidos de forma uniforme en todo el producto y más rápido que los tratamientos convencionales.

REFERENCIAS

[1] Zhang, G.V. Barbosa-Cánovas, V.M. Balasubramaniam, C. P. Dunne, D. F. Farkas, J T. C. Yuan (eds.). **2011**. *Nonthermal processing Technologies for Food*. Wiley-Blackwell, Oxford.

[2] S. Condón-Abanto, C. Arroyo, I. Álvarez, S. Condón, J.G. Lyng. *Int J Food Microbiol,* **2016**, *223*, pp. 9-16.

METAGENÓMICA APLICADA A LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Sanz-Puig M.[1], Lorenzo F.[1], Torres P.[2,3], Bertó R.[1], Orihuel E[1].

1 BETELGEUX S.L. Polígono Industrial Raconc, parcelas 2 y 3. 46729 Ador (Valencia, España). Tel. +34 962 871 345.

2 IMEGENAGRO. Instituto de Medicina Genómica S.L. C/Agustín Escardino, 9. Parc Científic de la Universitat de València. 46980 Paterna (Valencia, España). Tel. +34 963 212 340.

3 MICROOMICS SYSTEMS S.L. CRG (Centre for Genomic Regulation) PRBB, Barcelona (Spain). C/ Doctor Aiguader, 88, 08003 (Barcelona, España). Tel. +34 933 160 294 / 696551092.

r.berto@betelgeux.es

La metagenómica es una tecnología novedosa que surge en los últimos años como una rama de las ciencias genómicas. Se centra en el estudio del metagenoma de un determinado nicho, entendiendo por metagenoma al ADN total de una determinada muestra ambiental [1].

La metagenómica es una técnica de secuenciación de nueva generación (NGS) que se presenta como una firme alternativa a la microbiología tradicional, ya que nos permite identificar la totalidad de microorganismos presentes en una muestra, a nivel de género y especie, mediante la amplificación y secuenciación de su ADN, sin necesidad de que sean cultivables en el laboratorio [2][3].

Por estas razones, el presente estudio se ha centrado en la caracterización de la microbiota presente en los diferentes puntos de procesado de una industria de elaboración de productos de la pesca, tanto durante el proceso de producción como después de la limpieza y desinfección. Asimismo, se ha identificado la microbiota presente en el producto acabado y su evolución a lo largo del tiempo.

Los resultados obtenidos han permitido caracterizar la microbiota predominante en cada uno de los puntos del proceso productivo. La Figura 1 muestra el porcentaje de abundancia relativa de los 4 principales géneros microbianos identificados, en cada uno de los puntos de muestreo. Como se puede observar, el género *Pseudomonas* es el más abundante, sobretodo en los puntos de fileteado, pelado y loncheado. Cabe destacar también la abundancia relativa del género *Stenotrophomonas* principalmente en el proceso de corte.

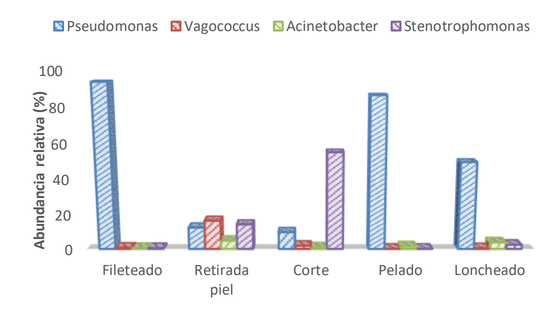


Figura 1: Abundancia relativa de los 4 géneros microbianos mayoritarios durante el proceso productivo en una industria pesquera.

Adicionalmente, se ha realizado el análisis metagenómico de muestras tomadas en los mismos puntos del proceso productivo pero esta vez después del proceso de limpieza y desinfección (Figura 2).

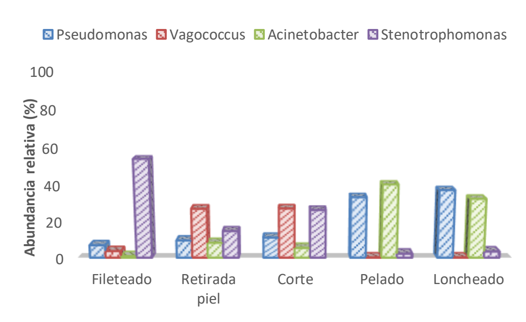


Figura 2: Abundancia relativa de los 4 géneros microbianos mayoritarios después de la limpieza y desinfección a lo largo del proceso productivo en una industria pesquera.

Tal y como se puede observar en la Figura 2, los niveles del género *Pseudomonas* se ven reducidos notablemente después del proceso de limpieza y desinfección. Sin embargo, se observa también que la disminución en la abundancia relativa de *Pseudomonas* va acompañada de un ligero aumento en la abundancia relativa de otros géneros microbianos como *Stenotrophomonas*, *Vagococcus* o *Acinetobacter.*

Finalmente, se ha analizado por metagenómica el producto acabado y su evolución a lo largo del tiempo, hasta un máximo de 7 días. Los resultados se muestran en la Figura 3.

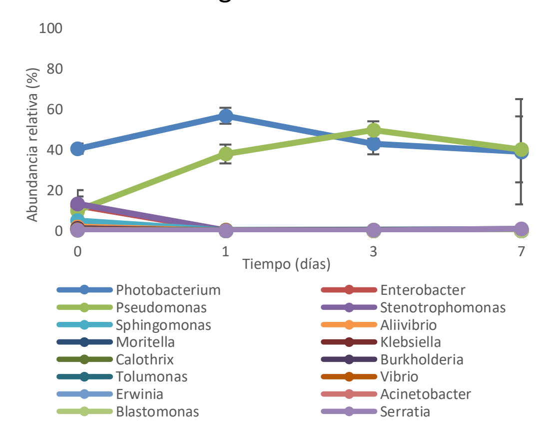


Figura 3: Principales géneros microbianos presentes en el producto acabado a lo largo del tiempo.

Aunque en la Figura 3 se representa la abundancia relativa de los 16 géneros microbianos encontrados en un mayor porcentaje en el producto acabado, se puede observar como a lo largo del tiempo predominan únicamente 2 géneros: *Photobacterium* y *Pseudomonas*.

Photobacterium presenta una abundancia relativa entorno al 40%, que se mantiene más o menos estable a lo largo del tiempo. En cambio, *Pseudomonas* presenta una abundancia relativa leve inicialmente, pero se observa un aumento a lo largo del tiempo, alcanzando una abundancia del 40% aproximadamente a partir de los 3 días.

Todos estos resultados nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

Pseudomonas es el principal género microbiano presente en una industria de procesado de pescado a lo largo de todo su proceso productivo.

Al aplicar los procesos de limpieza y desinfección se reducen los niveles de *Pseudomonas* a lo largo de todo el proceso productivo, aumentando ligeramente la abundancia relativa de otros géneros microbianos.

Photobacterium es un género bacteriano que se encuentra frecuentemente en la materia prima de origen pesquero, sobretodo en el caso de pescado procedente de acuicultura. Durante el proceso de producción, como se puede observar, no presenta una abundancia relativa importante, debido, probablemente, a la presencia de otros géneros bacterianos que se encuentran en mayor proporción. Sin embargo, representa de nuevo un papel importante en el producto acabado, donde la mayoría de géneros microbianos se ven reducidos a niveles muy bajos.

Pseudomonas cobra de nuevo un papel significativo en el producto acabado al aumentar su abundancia relativa a lo largo del tiempo [4].

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Instituto Valenciano de Competitividad Empresarial (IVACE) por la concesión del proyecto de investigación "Evaluación del impacto de las operaciones de limpieza y desinfección en la microbiota de las industrias alimentarias" (IMIDCA/2016/19).

REFERENCIAS

[1] R Hernández-León, I Velázquez-Sepúlveda, MC Orozco-Mosqueda, G Santoyo, *J Exp Bot*. **2010**, *79*, 133-1396.

[2] LM Coughlan, PD Cotter, C Hill, A Álvarez-Ordoñez, *Front. Microbiol*. **2015**, *6*, 672.

[3] CJ Doyle, PW O'Toole, PD Cotter. *Environ. Microbiol*, **2017**, *19*, 11, 4382-4391.

[4] T Moretro, B Moen, E Heir, AA Hansen, S Lansrud. *Int J. Food Microbiol*, **2016**, *237*, 98-108.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FRENTE A CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* MÚLTIRESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Silván J.M.[1], Zorraquín-Peña I.[2], González de Llano D.[2], Moreno-Arribas M.V.[2], Martínez-Rodríguez A.J.[1]

1 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM) / Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos / Grupo de Microbiología y Biocatálisis de Alimentos. C/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid.

2 Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM) / Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos / Grupo de Biotecnología Enológica Aplicada. C/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid.

jm.silvan@csic.es

La campilobacteriosis es la principal causa de enfermedad diarreica bacteriana asociada a los alimentos [1]. La resistencia de *Campylobacter* a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública, por lo que existe gran interés en desarrollar estrategias que sean capaces de reducir el impacto de este patógeno en la salud humana [2]. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia anti-bacteriana de nanopartículas de plata estabilizadas con glutation (NPs Ag-GSH) frente a diferentes cepas de *Campylobacter* multiresistentes a antibióticos aisladas de la cadena alimentaria de la carne de pollo y de pacientes hospitalarios.

Los resultados de la actividad anti-bacteriana de las NPs Ag-GSH frente a la cepa de referencia *C. jejuni* 11168 se muestran en la **Figura 1**. Las NPs Ag-GSH en el rango de concentración de 9,85 a 39,4 µg/mL resultaron ser bactericidas frente a *C. jejuni* 11168 tras 24 h de incubación. Concentraciones menores de las NPs Ag-GSH, en el rango de 1,23 a 4,92 µg/mL, inhibieron significativamente (p<0,05) el crecimiento de *C. jejuni* 11168. Estos resultados demuestran la alta capacidad que tienen las NPs Ag-GSH probadas en el presente estudio (tamaño medio de partícula en el rango de 10-50 nm), para inhibir el crecimiento del patógeno alimentario *Campylobacter*.

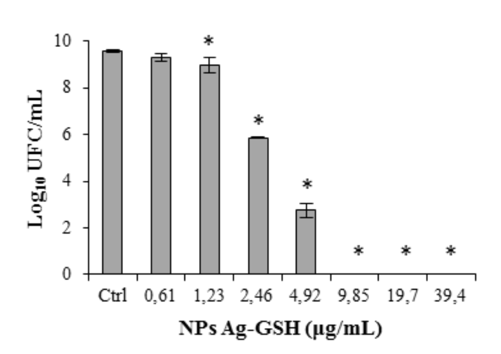


Figura 1: Actividad antibacteriana de las NPs Ag-GSH frente a *C. jejuni* 11168. Los resultados representan la media ± SD de Log_{10} UFC/mL (n = 3). Las barras con asterisco indican diferencias significativas (p<0,05) respecto al control de crecimiento (muestra sin nanopartículas).

La **Tabla 1** muestra la actividad antibacteriana de las NPs Ag-GSH frente a cepas de *Campylobacter* de diferentes especies y orígenes de aislamiento multiresistentes a antibióticos. Se observó que el efecto antibacteriano tuvo un carácter cepa-dependiente. Las NPs fueron bactericidas para la gran mayoría de las bacterias (87,5%) con un CMB en el rango de 19,7 a 39,4 µg/mL. Las cepas aisladas de la cadena alimentaria mostraron mayor susceptibilidad frente a las NPs (CMB 9,85

a 19,7 µg/mL para el 60% de las cepas) que las cepas clínicas (CMB 19,7 a 39,4 µg/mL para el 100% de las cepas), lo que sugiere que las cepas clínicas son capaces de resistir mejor la acción de las NPs. No se encontraron diferencias entre especies, tanto *C. jejuni* como *C. coli* mostraron rangos de CMB similares (9,85 a 39,4 µg/mL). Los resultados de las CMI obtenidos mostraron también un carácter cepa-dependiente. El 82,5% de las cepas presentaron una CMI en el rango de 9,85 a 19,7 µg/mL, con un CMI_{50} y un CMI_{90} de 19,7 µg/mL y 39,4 µg/mL, respectivamente. De nuevo las cepas de origen hospitalario mostraron una mayor resistencia a la acción de las NPs (80% cepas sensibles en el rango 19,7 a 39,4 µg/mL) que las cepas de origen alimentario (80% cepas sensibles en el rango CMI 9,85 a 19,87 µg/mL).

Tabla1: Actividad antibacteriana de las NPs Ag-GSH frente a cepas de *Campylobacter* de la cadena alimentaria (FC) y de aislados clínicos (C). **CMI**, concentración mínima inhibitoria; **CMB**, concentración mínima bactericida; **CMI_{50}**, CMI que inhibe el 50% de las cepas; **CMI_{90}**, CMI que inhibe el 90% de las cepas.
CMI_{50} = 19,7 µg/mL; **CMI_{90}** = 39,4 µg/mL.

Cadena aliment.	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)	Hospital	CMI (µg/mL)	CMB (µg/mL)
FC1	19,7	19,7	C1	9,85	19,7
FC2	9,85	9,85	C2	19,7	39,4
FC3	9,85	9,85	C3	9,85	39,4
FC4	9,85	9,85	C4	19,7	19,7
FC5	39,4	39,4	C5	19,7	19,7
FC6	4,92	9,85	C6	9,85	19,7
FC7	4,92	9,85	C7	9,85	19,7
FC8	9,85	19,7	C8	19,7	19,7
FC9	19,7	19,7	C9	19,7	19,7
FC10	19,7	19,7	C10	19,7	19,7
FC11	39,4	39,4	C11	19,7	39,4
FC12	19,7	39,4	C12	19,7	19,7
FC13	19,7	39,4	C13	19,7	19,7
FC14	19,7	39,4	C14	19,7	39,4
FC15	19,7	39,4	C15	19,7	19,7
FC16	19,7	19,7	C16	19,7	39,4
FC17	19,7	39,4	C17	39,4	39,4
FC18	19,7	19,7	C18	39,4	39,4
FC19	9,85	19,7	C19	19,7	39,4
FC20	19,7	39,4	C20	39,4	39,4

En este trabajo también se evaluó el efecto de las NPs Ag-GSH sobre la viabilidad de diferentes líneas celulares intestinales humanas (HT-29, Caco-2 y CCD-18). La exposición de las células a las NPs mostró un efecto significativamente (p<0,05) citotóxico respecto al control no tratado que fue dependiente de la concentración para todas las líneas celulares utilizadas en el rango de concentración de 9,85 a 39,4 µg/mL. Las concentraciones inferiores a 4.92 µg/mL no mostraron toxicidad. Sin embargo, más del 60% de las cepas de *Campylobacter* probadas en el presente estudio fueron sensibles a concentraciones de NPs Ag-GSH ≤9,85 µg/mL, indicando que el efecto antibacteriano deseado podría alcanzarse a concentraciones bajas sin potencial efecto citotóxico.

Por tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las NPs Ag-GSH podrían ser aplicables como potenciales agentes antimicrobianos para el control del patógeno alimentario *Campylobacter* en diferentes lugares de la cadena alimentaria, como en las etapas de producción y procesamiento de la carne de aves de corral, o bien como una prometedora alternativa al uso de los desinfectantes químicos actuales utilizados para el control de la formación de biofilms de *Campylobacter.* Aunque se necesitan más estudios de toxicidad, la práctica de combinar NPs de plata con otros compuestos parece muy prometedora, ya que permitiría utilizar concentraciones más bajas de NPs. En el caso de *Campylobacter*, las NPs de plata podrían ayudar a reducir la resistencia a los antibióticos, permitiendo reducir las dosis terapéuticas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos AGL 2013-47694-R y AGL2017-89566-R del CSIC.

REFERENCIAS

[1] M. Ganan, J.M. Silván, A. V. Carrascosa, and A.J. Martínez-Rodríguez. *Food Control,* ***2012****, 24,* 6–14.

[2] European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control *EFSA J.,* ***2017****,15:*4694.

THE ANTI-BIOFILM ACTIVITY OF CLOVE ESSENTIAL OIL ON *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR ENTERITIDIS

Somrani M.[1,2] , Debbabi H.[2], Abidi F.[3], Palop A.[1]

1 Universidad Politécnica de Cartagena/Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Paseo Alfonso XIII, 48, Cartagena ,30203.

2 University of Carthage/The Agronomic National Institute of Tunis / Economy, Science and food technology /food technology. 43 avenue Charles Nicolle Tunisie, 1082.

3 University of Carthage/ The National Institute of applied science and technology/ biological engineering and chemistry/Protein and Bio Active Molecule Engineering / Centre Urbain Nord, 1080.

Mariouma19081989@hotmail.com

A biofilm is a community of bacteria surrounded by a self-produced or extracellular polymeric substance (EPS), including polysaccharides, DNA, protein, and lipids that attach to a surface. [1]. Bacteria in a biofilm are relatively resistant to changes in environmental conditions, antimicrobial agents and to host immune responses. Moreover, the cells form a biofilm to survive adverse and tough conditions [2]. One of the food pathogen and bioflm forming bacteria is *Salmonella enterica,* which is a motile, aerobic to facultative anaerobic, nonspore-forming and a gram-negative bacterium [3].

As the chemical cleaning products failed in removing biofilms, in this work we used a natural compound, such as the clove essential oil in order to explore its effect on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms.

Salmonella enterica serovar Enteritidis CECT 4300 was used in this study and it was provided by the Spanish Type Culture Collection(CECT, Valencia, Spain). Clove essential oil (EO) was brought from Tunisia and dissolved in 95% v/v ethanol.

To evaluate the antimicrobial activity of the EO, two methods were used. The first one is the disc diffusion assay [4] in which the zones of growth inhibition around each of the disks impregnated with the essential oil, the antibiotic (positive control) and ethanol (negative control) were measured in mm in order to figure out the susceptibility of the strain. The second one is the minimal inhibitory concentration (MIC) where the macrobroth dilution method was adopted [5].

Regarding the biofilm inhibition assays, the effect of the clove essential oil was tested on initial cell attachment and on preformed biofilms. For the initial cell attachment assays, different doses of essential oil (0.5 MIC, MIC and 2MIC) were incubated with the inoculum in the 96-well Polystyrene plate for 24h at 37°C. Then it was tested on preformed biofilms that were allowed to be formed for 24 h. After that incubation, different doses of essential oil (0.5 MIC, MIC and 2 MIC) were added and the cultures were incubated over a series of time intervals (1, 5 and 20 h) [6]. The biofilm biomass was assessed by the crystal violet assay [7]. Finally, the Values were analyzed by ANOVA to see if there were significant differences or not.

The antimicrobial activity results shown below (Table 1) confirmed that the strain is sensitive to clove EO as the inhibition zone was between 9 and 14 mm [4]

	Clove EO
Inhibition zone (mm)	12.33±0.45
MIC (mg/ml)	0.1

Table 1: growth inhibition (mm) zones and Minimal inhibitory concentration (MIC) (mg/ml) of clove essential oil.

For the biofilm formation, the EO has been more effective on initial cell attachment than on preformed biofilms, which confirms that bacteria cells among the biofilms develop more resistance to antimicrobials than planktonic cells, so that they are more difficult to eliminate [8]. Moreover, the effect of the three MICs tested reduced significantly with time (Fig 1) with the oil being most effective after one hour of incubation.

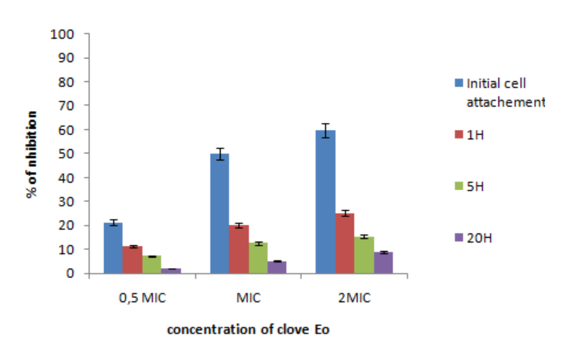


Figure 1: Effect of different concentrations of clove essential oil on initial cell attachment and on preformed biofilm of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis incubated with the oil for 1 h, 5 h and 20 h, as determined by the crystal violet assay.

Although the effect of Clove EO on the initial cell attachment was great, it affected less the preformed biofilms because once the biofilm is formed, it has more chance to survive stress conditions

The use of clove EO cannot inhibit biofilm formation in food processing environments but it may be better to combine it with another essential oil for more synergy or together with other treatment to be effective.

ACKNOWLEDGEMENT

This research will be financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of the Spanish Government and European Regional Development Fund (ERDF) through project AGL2017-86840-C2-1-R and the scholarship is provided from The University of Carthage Tunisia.

REFERENCES

[1] B F Gilmore, P B Flynn, S O'Brien, N Hickok, T Freeman, P Bourke, *Trends Biotechnol.*, **2018**, *36*, 627-638.

[2] A Kumar, A Alam, M Rani, N Z Ehtesham, S E Hasnain, *Int. J. Med. Microbiol.* **2017**, *307*, 481-489.

[3] J W Underwood, R Blauwiekel, M L Delano,R Gillesby,S A Mischler, A Schoell, "Laboratory Animal Medicine" (Academic press., 2015)

[4] D Djenane, J Yangüela, L Montañés, M Djerbal, P Roncalés, *Food Control*, **2011**, *22*, 1046-1053.

[5] M Balouiri, M Sadiki, I S S Koraichi, *J. Pharm. Anal.*, **2016**, *6*, 71–79.

[6] M Sandasi, C M Leonard, A M Viljoen, *Food Control*, **2008**, *19*, 1070–1075.

[7] D Djordjevic, M Wiedmann, L A McLandsborough, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*, 2950-2958.

[8] M Simões, L C Simões, M J Vieira, *Water Res.*,**2009**, *43*, 229–237.

BLUEPHAGE©: EL MÉTODO MÁS RÁPIDO DISPONIBLE PARA LA DETECCIÓN DE COLIFAGOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN AGUAS Y ALIMENTOS

Toribio-Avedillo D., Martín-Díaz J., Blanch A.R, Muniesa M.
Universidad de Barcelona, Facultad de Biología, Departamento de Genética, Microbiología y Estadística, Avda. Diagonal 643, CP 08028
d.toribio.avedillo@ub.edu

Dentro de indicadores de contaminación fecal en agua y alimentos, las bacterias son los organismos más empleados, en concreto los coliformes fecales como *Escherichia coli*. No obstante, el uso exclusivo de indicadores bacterianos presenta un importante problema, ya que existen patógenos como los virus cuyo comportamiento no es predecible tan sólo usando indicadores bacterianos. Esto se debe a que los virus son organismos con estructuras y ciclo vital muy diferentes, que les confieren diferente persistencia en el ambiente y resistencia a tratamientos de desinfección.

Los colifagos, bacteriófagos que infectan a *E. coli*, se proponen como solución a este problema. Presentan unas características adecuadas como indicadores fecales víricos: se comportan como los virus animales frente a tratamientos de desinfección y persisten de manera similar en el ambiente, solo están presentes en el ambiente cuando hay un suceso de contaminación fecal, son específicos de huésped de origen fecal y su metodología de detección es sencilla y rápida. Diferenciamos dos grupos dentro de los colifagos: los colifagos somáticos, grupo heterogéneo y abundante de fagos que infectan a través de la pared bacteriana; y los colifagos F-específicos, grupo más homogéneo, pero menos abundante que infecta a través del pili conjugativo codificado por un plásmido F.

Los colifagos son buenos indicadores de contaminación fecal y viral en aguas y alimentos gracias a la robustez y rentabilidad de los métodos estandarizados de detección disponibles. Varios países como Australia o Colombia y organizaciones como la ISSC y la FDA ya los incluyen en sus políticas de gestión y está prevista su introducción en normativas como la revisión de la Directiva para Aguas de Consumo para 2020 o la nueva propuesta para la reutilización de aguas de la Unión Europea.

Sin embargo, los métodos tradicionales de detección aún requieren 18h y un tiempo apreciable previo para la preparación de stocks calibrados de la bacteria huésped. Por todo esto, su implementación rutinaria se favorecería si existieran kits comerciales sencillos y rápidos. Con este objetivo se desarrolló la metodología Bluephage© [1].

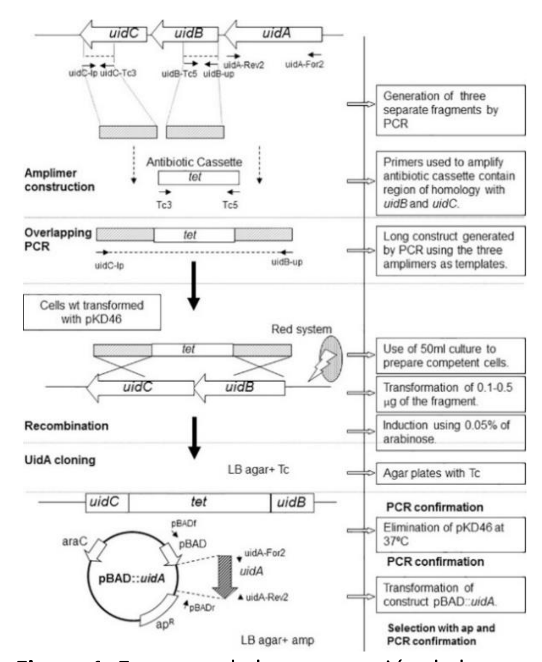
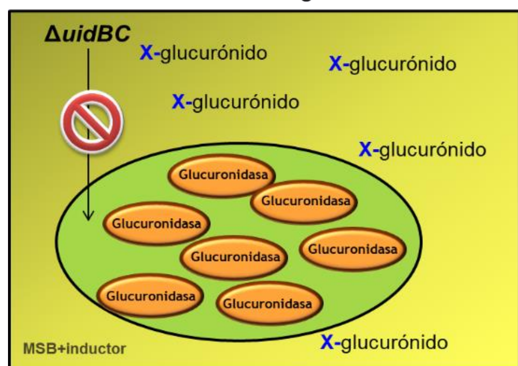


Figura 1: Esquema de la construcción de la cepa CB10 empleada en ensayos Bluephage©.

Bluephage© emplea cepas de *E. coli* que se han modificado eliminando los genes que codifican los transportadores de ácido glucurónico al interior celular (*uidB* y *uidC*) y sobreexpresando la enzima β-glucuronidasa (*uidA*) que degrada ácido glucurónico. Como consecuencia, la enzima se acumula dentro de la célula y no tiene contacto con el sustrato puesto que no es internalizado. En presencia de fagos que lisen la célula, la enzima se libera al medio, que contiene un análogo cromógeno del sustrato, produciéndose un cambio de color del medio de amarillo a azul debido a su degradación.



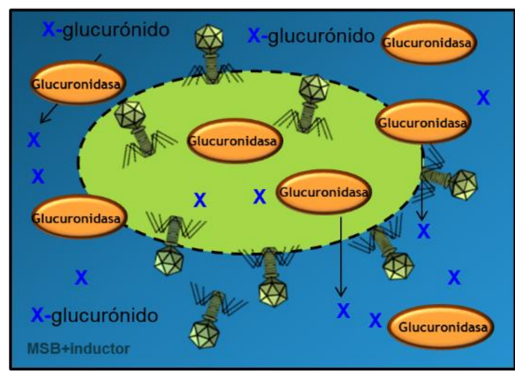


Figura 2. Diagrama explicativo del funcionamiento del método Bluephage©

Bluephage© es el método microbiológico para detectar indicadores de contaminación fecal más rápido que existe, siendo capaz de detectar hasta 1 colifago somático en menos de 3,5h, dentro del rango de una jornada laboral. Bluephage© es aplicable a diferentes tipos de muestra (aguas, lodos, alimentos), se puede ajustar a diversos volúmenes, y permite análisis cualitativos, pero por número más probable también ofrece resultados cuantitativos. Están en desarrollo actualmente cepas que permiten la detección de colifagos totales y F-específicos mediante esta metodología.

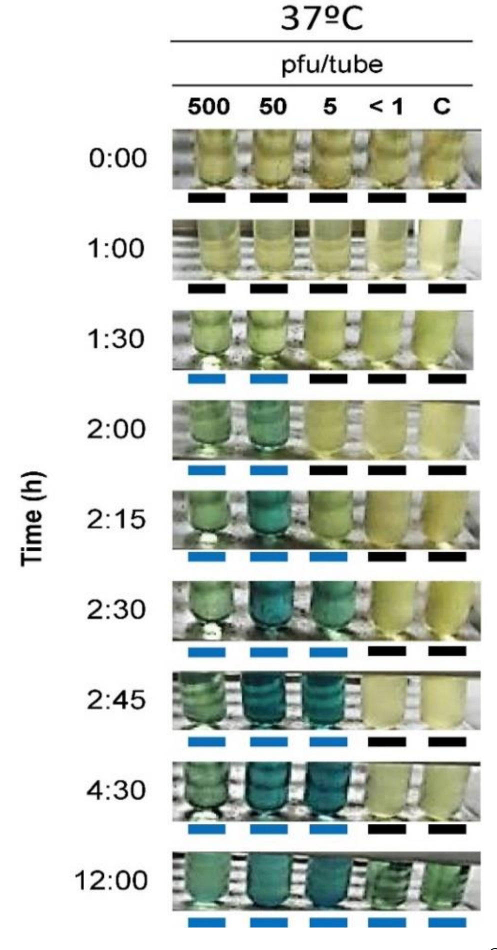


Figura 3: Ejemplo de ensayo de Bluephage© en presencia de concentraciones decrecientes de fagos a lo largo del tiempo en tubo. El azul indica un resultado positivo y el amarillo negativo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores son miembros de un grupo de investigación consolidado de la Generalitat de Catalunya (2014SGR7), la Xarxa de Referencia en Biotecnologia (XRB) y el Institut de Recerca de l'Aigua/Universitat de Barcelona. Este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2016-75536).

REFERENCIAS

[1] M. Muniesa, et al. *Water Res.*, **2018,** *128*, 10-19.

SESIÓN 3A. PRODUCTOS CÁRNICOS

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y CAPACIDAD PARA FORMAR *BIOFILM* EN BACTERIAS DE ORIGEN CÁRNICO: ASPECTOS DE INTERÉS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Capita R.[1,2], Alonso-Calleja C.[1,2]

1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, España.

2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León. Calle La Serna, nº 58, 24071-León, España.

rosa.capita@unileon.es; carlos.alonso.calleja@unileon.es

La **resistencia a los antibióticos** es un grave problema de Salud Pública, de importancia creciente, en el ámbito mundial. Se estima que actualmente se producen unos 700.000 fallecimientos anuales como consecuencia de la resistencia a los antibióticos (25.000 de ellos en la Unión Europea y 2.800 en España). Además, las previsiones apuntan a que dentro de aproximadamente tres décadas las infecciones por bacterias resistentes podrían provocar la muerte de 10 millones de personas cada año [1].

Si bien el uso de antibióticos (especialmente cuando no se siguen pautas de administración correctas) es el principal factor de riesgo en la emergencia y diseminación de determinantes de resistencia, se está dando cada vez mayor importancia al papel de la Industria Alimentaria, que podría contribuir al incremento de la prevalencia de resistencia a antibióticos principalmente a través de cuatro vías: 1) uso de antimicrobianos (antibióticos y biocidas) a lo largo de la cadena de producción de alimentos, 2) empleo de microorganismos añadidos de forma intencionada a los alimentos con una finalidad probiótica y/o tecnológica, 3) uso de cultivos modificados genéticamente y 4) empleo de determinados tratamientos tecnológicos a dosis subletales [2].

En los últimos años se ha observado un aumento de la prevalencia de resistencia a los antibióticos en bacterias de origen cárnico, siendo frecuente la presencia en estos alimentos de cepas con múltiples genes de resistencia [3-8].

Por lo que respecta a los biocidas, en la Industria Alimentaria no es infrecuente su empleo a dosis subinhibitorias (p. ej., cálculo incorrecto de las concentraciones, pérdida de efectividad como consecuencia de un almacenamiento inadecuado o de la presencia de cantidades excesivas de materia orgánica, uso de combinaciones de aditivos a dosis bajas o acceso limitado de los desinfectantes a algunas zonas) [9, 10]. En estudios previos se ha demostrado que el contacto con dosis subinhibitorias de descontaminantes de la carne, aditivos alimentarios o desinfectantes modifica el patrón de resistencia a antibióticos en cepas de origen cárnico de *Salmonella* [11, 12], *Listeria monocytogenes* [11, 13] y *Escherichia coli* [9, 14], reduciendo su susceptibilidad a diferentes compuestos antimicrobianos. Dichas transformaciones están relacionadas principalmente con un incremento de la expresión de bombas de expulsión inespecíficas [15, 16], con cambios en la superficie bacteriana (hidrofobicidad, fluidez) [9, 17] y con modificaciones en la morfología y ultraestructura celulares [9]. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de emplear concentraciones correctas de los biocidas en la Industria Alimentaria.

La mayoría de los microrganismos viven agrupados en forma de **biofilms o películas microbianas**, viendo así incrementada, con

respecto a las células planctónicas, su resistencia a diferentes factores disgenésicos. En la Industria Alimentaria, los *biofilms* son una fuente importante de contaminación, habiéndose estimado que el 60% de los brotes de enfermedad transmitida por alimentos están asociados a estas estructuras [18, 19].

Con ayuda de varios programas informáticos desarrollados (BioRCA 1.3, BioRCA 1.4, BioRCA 1.7 y BioRCA 1.8), se ha observado que la exposición previa a dosis bajas de nitrito sódico o hipoclorito sódico incrementa la capacidad para formar *biofilm* de *E. coli* [9], *Salmonella* [20] y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina [10]. Se ha determinado *in vitro* el efecto de suspensiones de bacteriófagos sobre los *biofilms* de *L. monocytogenes*, habiéndose demostrado su eficacia, de forma muy marcada a partir de 10^8 ufp/ml. Asimismo, se ha estudiado el mecanismo de actuación de diferentes desinfectantes sobre los *biofilms*, demostrándose, por ejemplo, que el hipoclorito sódico basa su acción principalmente en la inactivación celular, aumentando el porcentaje de células muertas a medida que se incrementa la concentración del biocida, mientras que el cloruro de benzalconio provoca el desprendimiento del *biofilm*, con una importante reducción del biovolumen. Otras líneas de investigación recientes en relación con los *biofilms* están dirigidas al estudio de sus distintos componentes individuales, a la determinación de la influencia de diferentes factores (p. ej., tiempo de incubación y superficie de contacto) sobre su arquitectura o al estudio de los *biofilms* mixtos, constituidos por varios grupos microbianos [19, 21].

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-29645) y Ministerio de Industria, Economía y Competitividad (INIA; RTA2014-00045-C03-02).

REFERENCIAS

[1] M.E.A. de Kraker, et al. *PLoS Med.*, **2016**, *13*(11), e1002184.

[2] R. Capita, C. Alonso-Calleja, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53*, 11-48.

[3] E. Álvarez-Fernández, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2012**, *153*, 281-87.

[4] A. Alonso-Hernando, et al. *Food Control*, **2012**, *23*, 37-41.

[5] E. Álvarez-Fernández, et al. *Food Control*, **2013**, *30*, 227-34.

[6] E. Guerrero-Ramos, et al. *Food Microbiol.*, **2016**, *53*, 156-64.

[7] E. Guerrero-Ramos, et al. *J. Food Prot.*, **2016**, *79*, 748-56.

[8] L. Buzón-Durán, et al. *Poultry Sci.,* **2017**, *96*, 4046-52.

[9] R. Capita, et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2014**, *80*, 1268-80.

[10] L. Buzón-Durán, et al. *Food Microbiol.,* **2017**, *65*, 294-301.

[11] A. Alonso-Hernando, et al. *Food Control*, **2009**, *20*, 1108-11.

[12] D. Molina-González, et al. *Food Control*, **2014**, *40*, 329-34.

[13] C. Rodríguez-Melcón, et al. Congreso ACOFESAL, **2017**, Premio Mejor Comunicación.

[14] R. Capita, et al. *Food Microbiol.*, **2013**, *34*, 112-17.

[15] C. Alonso-Calleja, et al. *Food Control*, **2015**, *56*, 86-94.

[16] A. Alonso-Hernando, et al. *Food Microbiol.*, **2009**, *26*, 905-9.

[17] A. Alonso-Hernando, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2010**, 137, 130-136.

[18] M. Díez-García, et al. *Food Microbiol.*, **2012**, 31, 173-180.

[19] C. González-Machado, et al. *PLoS ONE*, **2018**, *13*(7), e0200011.

[20] R. Capita, et al. *Foodborne Path. Dis.*, **2017**, *14*, 350-6.

[21] C. Rodríguez-Melcón, et al. *Food Microbiol.*, **2018**, en prensa, doi: 10.1016/j.fm.2018.06.016.

MARCADORES DE MOVILIDAD GÉNICA HORIZONTAL IMPLICADOS EN LA DISEMINACIÓN DE RESISTENCIAS A LOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS A TRAVÉS DE ALIMENTOS Y AGUAS

González D.[1,2], Pérez-Etayo L.[1], Vitas A.I.[1,2]
1 Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra. C/Irunlarrea s/n, 31008, Pamplona.
2 IDISNA. Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra. Pamplona.
dgonzalez@unav.es

Introducción

Son varios los mecanismos genéticos involucrados en la adquisición y dispersión de las resistencias a antibióticos β-lactámicos, destacando los plásmidos que pueden incluir transposones, secuencias de inserción, integrones e intrones. Los integrones (int) son elementos de ADN capaces de contener casetes de genes (incluidos genes de resistencia) y diseminarlos. Las clases 1 (intI1) y 2 (intI2) son las más involucradas en las resistencias a antibióticos [1], mientras que la presencia de la clase 3 (intI3) en *Enterobacteriaceae* es muy limitada. Además, los genes que expresan beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) se asocian con secuencias de inserción (IS). Las IS son los elementos transponibles más pequeños (<2.5 kb) y se clasifican en familias de acuerdo con diferentes características, siendo las transposasas (enzimas que catalizan el movimiento IS) el principal sistema de clasificación utilizado. Está bien documentado que IS26, ISEcP1, ISCR1 e IS903 en asociación con el integrón de clase 1 son los elementos más implicados en estos procesos. La investigación de estos elementos podría ser crítica para predecir la posible propagación de cepas productoras de BLEE. En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de diferentes tipos de integrones (IntI1, IntI2 e IntI3) y secuencias de inserción (ISEcP1, IS26, ISCR1 e IS903) en una colección de cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en Navarra.

Material y Métodos

Se analizaron 101 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas en distintos nichos ecológicos de Navarra que incluían productos cárnicos (*n*=48), piensos (*n*=6), entornos de producción animal (*n*=14 suelo de granjas) y entornos acuáticos (*n*=23 aguas de EDAR, *n*=10 aguas ríos).
La detección de los integrones de clase 1, 2 y 3 se realizó mediante la técnica de PCR descrita por Machado [1]. Por otro lado, la detección de la secuencia de inserción IS26 se realizó utilizando la PCR descrita por Millán [2], mientras que el estudio de ISEcP1, ISCR1 e IS903 se llevó a cabo siguiendo las PCR descritas por Eckert [3], Novais [4] y Poirel [5], respectivamente. La extracción del DNA de cada cepa se realizó utilizando el kit *DNeasy® Blood & Tissue* (Qiagen, Barcelona, Spain).

Resultados y Discusión

El análisis de los integrones (Figura 1) mostró que la mayor parte de las cepas contenía el intI1 (91%), mientras que el intI2 solo estaba presente en un 9,9% (la mayoría de ellas aisladas de alimentos) y no se detectó el intI3.
Respecto a las IS (Figura 2), la prevalente en todos los nichos fue IS26 (99%) seguida de ISEcP1 (70%) e IS903 (57,4%), mientras que el porcentaje de cepas portadoras de

ISCR1 fue el más bajo (8,9%) pero predominante en alimentos.

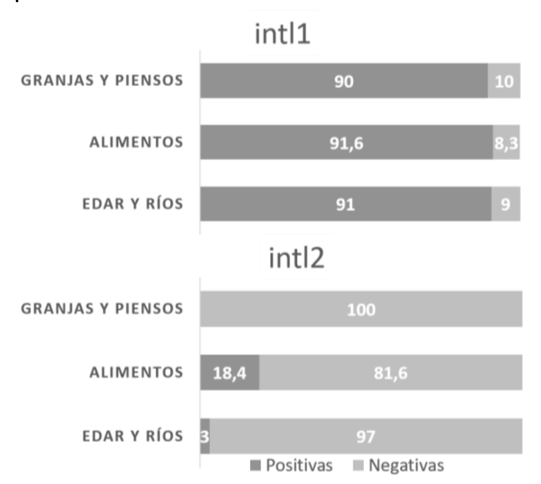


Figura 1. Porcentaje de cepas portadoras de inl1 e intl2.

Es interesante el hecho de que las cepas procedentes de ambientes acuáticos muestran prevalencias de todas las IS iguales o superiores al 70% (con excepción de ISCR1). Por el contrario, el principal nicho en el que se detectaron cepas portadoras de ISCR1 fueron los alimentos. Finalmente, cabe mencionar las asociaciones de varias IS encontradas en varias cepas, pudiéndose establecer de esta manera plataformas genéticas (Figura 3). Entre ellas destaca la asociación IS26-ISEcP1-IS903 en el 38% de las cepas y la presencia de las 4 IS en 2 cepas (una procedente de aguas y otra de alimentos).

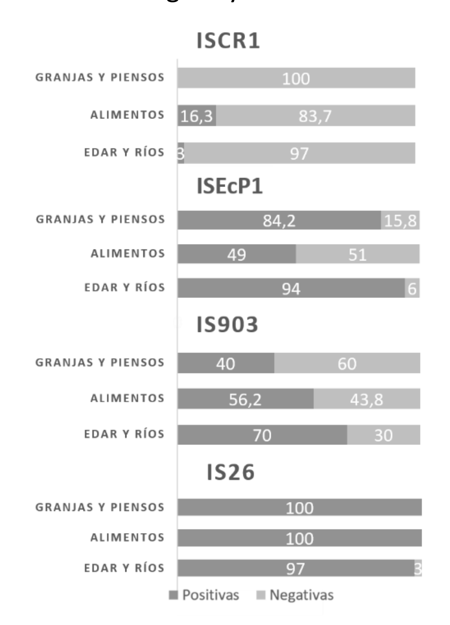


Figura 2. Porcentaje de cepas portadoras de IS.

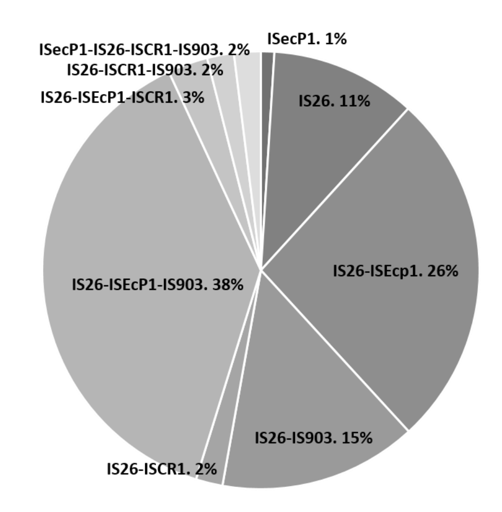


Figura 3. Porcentaje de asociaciones de IS.

Conclusión

La elevada presencia de marcadores de movilidad génica horizontal entre las cepas de *E. coli*-BLEE procedentes de alimentos y ambientes acuáticos, así como las frecuentes asociaciones de IS detectadas, indica que estos elementos genéticos están favoreciendo la diseminación de resistencias a antibióticos β-lactámicos en la comunidad a través de las aguas residuales y el consumo de alimentos.

REFERENCIAS

[1] Machado, E. et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*(5):1823–29.

[2] Millán, B. et al. *Biomédica,* **2013***,* *33*(2):269-75.

[3] Eckert, C. et al. *J. Antimicrob Chemother*. **2006**, *57*(1):14-23

[4] Novais, A. et al. *Antimicrob Agents Chemother*, **2006**, *50*(8):2741–50.

[5] Poirel, L. et al. *Antimicrob Agents Chemother*. **2003**, *47*(9):2938-45

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E (VHE) EN ALIMENTOS DERIVADOS DEL CERDO

Gutiérrez-Boada M.[1], Hernández M.[1], González-Benzaquén N.[2], Goyache J.[2], Rodríguez-Lázaro D.[1]

1 Área de Microbiología, Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Burgos, Burgos, Spain.

2 Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET. Universidad Complutense de Madrid. drlazaro@ubu.es

Introducción

El virus de la hepatitis E (VHE) es un virus esférico sin envoltura cuyo genoma se compone de una única hebra de ARN de sentido positivo de 7,5 kb. Este genoma posee 3 regiones de lectura abierta (ORF), responsables de su infectividad [1]. Existen 4 genotipos, siendo el genotipo 3 el responsable de la transmisión zoonótica, y el cerdo su hospedador principal. Se inactiva por calor [2] (70°C durante 120 segundos o tratamientos equivalentes), pero resiste la inactivación por las condiciones ácidas y alcalinas leves del tracto intestinal, lo que facilita su transmisión fecal-oral [3].

El periodo medio de incubación es de 40 días; en ese tiempo, el virus alcanza el hígado por la vena porta, se replica y se acumula en la bilis, desde donde pasa al intestino a través del conducto biliar; de ahí, se excreta en heces durante 2 semanas, periodo durante el cual el virus puede estar presente también en suero. Durante este tiempo, los infectados actúan de reservorio del virus, pudiéndolo transmitir a personas sanas [4]. La hepatitis E es generalmente asintomática, pero puede causar mortalidad en personas inmunodeprimidas [1]. En la actualidad no existe ningún tratamiento eficaz que elimine el VHE una vez adquirido.

Objetivos

El objetivo de este estudio es conocer el papel que juega la cadena alimentaria en la transmisión del VHE para lo cual se investigó la presencia del virus en alimentos de la cadena de producción porcina. Dado que no se conocía su prevalencia en España, se analizaron 378 productos cárnicos (276 chorizos y 102 morcillas).

Materiales y métodos

Se realizó un muestreo de 378 alimentos procedentes de distintos establecimientos españoles. Estos alimentos se elaboran principalmente con cerdo y entre sus ingredientes destaca la carne de cerdo ibérico en el caso del chorizo, mientras que la morcilla está compuesta principalmente por tocino, grasa y sangre de cerdo.

Se realizó la extracción de ARN (RNeasy® Lipid Tissue, Qiagen [5]) utilizando como control de proceso el norovirus murino. Este virus fue añadido a todas las muestras para controlar el proceso de purificación de ARN viral. Tras la extracción, se realizó la detección mediante RT-qPCR para detectar la presencia o ausencia de ambos virus. Se consideraron positivas aquellas muestras con un C_q inferior a 40.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos mostraron un total de 125 muestras positivas a VHE (33%), de las cuales 103 eran chorizo (37%), y 22 (22%) eran morcilla. El C_q promedio de las muestras de chorizo se situó en 36,3 ± 3,08 y las muestras de morcilla 36,2 ± 3,04. Estos valores indican una eficiencia de extracción superior al 10% y por tanto que el contenido en ARN de VHE en las muestras es elevado. Respecto al norovirus murino, todas las muestras fueron positivas, lo que señaló una correcta extracción del ARN. En la

Figura 1 se representa el número de ciclos de amplificación (C_q) frente a la fluorescencia emitida de 30 muestras de chorizo y morcilla, dos controles positivos (PC VHE) y dos controles negativos (NTC VHE).

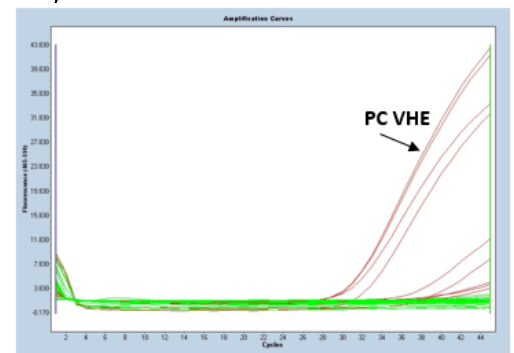


Figura 1. Fluorescencia emitida de la sonda Taqman frente al número de ciclos de amplificación en chorizo y morcilla. Cada curva representa la amplificación para cada muestra. PC VHE: control positivo

La Figura 2 indica el número de ciclos de amplificación (C_q) frente a la fluorescencia respecto al norovirus murino. Como se observa, todas las muestras fueron positivas.

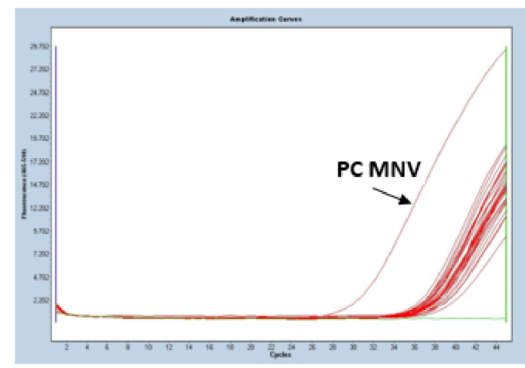


Figura 2. Fluorescencia emitida de la sonda Taqman frente al número de ciclos de amplificación en chorizo y morcilla. Cada curva representa la amplificación para cada muestra. PC MNV: control positivo

Conclusiones

Estos datos demuestran que el virus está presente en la cadena alimentaria bien por una distribución orgánica del virus hacia los tejidos, una deficiente manipulación de los animales porcinos durante el sacrificio y la elaboración de los embutidos crudos curados, como probablemente por un tratamiento térmico insuficiente de los alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2014-00024-C04 "*Análisis y control integrado de Toxoplasma gondii y del virus de la hepatitis E en la cadena de producción porcina*".

REFERENCIAS

[1] Pérez-Gracia M. T., Mateos-Lindemann M. L. *Medicina clínica*, **2012**, *139*: 404-411.

[2] Johne R., Trojnar E., Filter M., Hofmann J. *Appl. Environm. Microbiol.*, **2016**, *82*: 4225- 4231.

[3] Rodríguez-Friasa F., Jardi R. Buti M. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, **2012**, *30*: 624-634.

[4] Jiménez de Oya N., Escribano-Romero E., Blázquez A. B., Saiz J. C. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2007**, *30:* 408-418.

[5] QIAGEN. 2009. RNeasy® Lipid Tissue Handbook. Disponible en: https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/ARN/total-ARN/rneasy-lipidtissue-mini-kit/#orderinginformation. Última revisión: 22/06/2018.

REDUCCIÓN DE SODIO EN PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS: CONSECUENCIAS SOBRE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Jofré A., Serra-Castelló C., Garriga M., Bover-Cid S.

IRTA-Programa de Seguridad Alimentaria. Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells (Girona)
sara.bovercid@irta.cat

Introducción

La reducción de la ingesta de sodio en la población europea es una prioridad de las autoridades de salud pública desde hace más de una década [1]. Sin embargo, la reducción de sodio para la mejora nutricional de productos alimenticios es un desafío importante para la industria cárnica ya que puede comprometer la seguridad alimentaria.

Objetivo

El objetivo del presente estudio fue evaluar y comparar la vida útil segura de jamón cocido estándar con la del reducido en sodio de cuatro marcas comerciales diferentes.

Material y Métodos

La velocidad de crecimiento de *Listeria monocytogenes* (cepas 12MOB089LM y CTC1034) se determinó experimentalmente a través de *challenge tests* en producto loncheado envasado al vacío conservado a 7°C hasta un máximo de 2 meses. La enumeración de *L. monocytogenes* se realizó en medio cromogénico. Los jamones cocidos evaluados se caracterizaron fisicoquímicamente (pH, a_w y porcentaje de sodio). La velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* se estimó con la aplicación *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP [2]).

Resultados

El crecimiento de *L. monocytogenes* se vio afectado por la formulación y la cepa inoculada, siendo la 12MOB089LM 30-50% más rápida en productos reducidos en sodio que en sus equivalentes de formulación estándar y la cepa CTC1034 la menos sensible a la sal y a los ácidos orgánicos. El ajuste de las predicciones del FSSP a los resultados experimentales fue bueno en los jamones estándar y subestimó el crecimiento de *L. monocytogenes* en aquellos reducidos en sodio.

Conclusiones

El contenido en sal de un alimento es uno de los factores que determina su a_w, un parámetro clave pero no el único, que determina la capacidad de crecimiento de los microorganismos en general y *L. monocytogenes* en particular.

En los estudios de *challenge test* es crucial tanto una adecuada selección de cepas como una exhaustiva caracterización del producto.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto INIA RTA2012-00030 y el Laboratorio Nacional de Referencia para L. monocytogenes*.*

REFERENCIAS

[1] EFSA. *The EFSA J.*, **2005**, *193*:1-19.

[2] FSSP. Food Spoilage and Safety Predictor v3.1, http://fssp.food.dtu.dk/.

SELECCIÓN DE AGENTES DE BIOCONTROL PARA REDUCIR EL ÁCIDO CICLOPIAZÓNICO EN DERIVADOS CÁRNICOS CURADO-MADURADOS

Peromingo B., Delgado J., Núñez F., Andrade M.J., Rodríguez M.
Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Instituto Universitario de Carne y Productos Cárnicos, Higiene y Seguridad Alimentaria. Avda. de las Ciencias, s/n, 10003 Cáceres, España.
belenperomingo@unex.es

Resumen
El ácido ciclopiazónico (ACP), una micotoxina potencialmente perjudicial para la salud del consumidor, es producido por mohos encontrados habitualmente en los derivados cárnicos curado-madurados. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes agentes de biocontrol para prevenir la producción de ACP por parte de *Penicillium griseofulvum* en salchichón. Se estudió el efecto de una cepa de *Debaryomyces hansenii*, y otra de *Penicillium chrysogenum* frente a *P. griseofulvum* en medios de cultivo elaborados con salchichón, obteniéndose el mejor resultado con la cepa del moho. Posteriormente, se inocularon dos lotes de salchichones, uno con *P. griseofulvum* y otro con este moho toxigénico junto a *P. chrysogenum* y se procesaron en cámaras de maduración durante 21 días. *P. griseofulvum* produjo gran cantidad de ACP en salchichón; sin embargo, en presencia de *P. chrysogenum* la producción de esta micotoxina fue significativamente menor ($p \leq 0,05$) al final de la maduración. En conclusión, *P. chrysogenum* puede proponerse como agente bioprotector, dada su capacidad de reducir los niveles de ACP producido por *P. griseofulvum* en derivados cárnicos curado-madurados.

Introducción
Durante la maduración de los derivados cárnicos curado-madurados es habitual el crecimiento de mohos en su superficie, entre los que se encuentra *P. griseofulvum* productor de ACP, micotoxina potencialmente perjudicial para la salud del consumidor [2]. Una de las estrategias de control de mohos toxigénicos más prometedoras en los derivados cárnicos curado-madurados es la utilización de agentes de biocontrol, como los mohos y levaduras que se encuentran habitualmente en estos productos. Concretamente, *D. hansenii* y *P. chrysogenum* han mostrado capacidad antifúngica frente a mohos ocratoxigénicos en productos cárnicos [1,3, 4]; sin embargo, esta capacidad no ha sido estudiada frente a mohos productores de ACP. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de agentes de biocontrol sobre la producción de ACP por *P. griseofulvum* en salchichón.

Material y Métodos
Material biológico. Se utilizaron *P. griseofulvum* IBT 14319 productor de ACP, y *D. hansenii* FHSCC 253H y *P. chrysogenum* CECT 20922 como agentes de biocontrol.
Efecto de agentes de biocontrol frente a *P. griseofulvum* en medios elaborados con salchichón. Se inoculó *P. griseofulvum* en presencia y ausencia de *D. hansenii* y *P. chrysogenum* de forma individual y conjunta en placas elaboradas con salchichón liofilizado (a_w 0,956). Tras su incubación a 12 °C durante 21 días se realizó la cuantificación de ACP mediante UHPLC-MS/MS [2]. El ensayo se realizó por triplicado.
Efecto de agentes de biocontrol frente a *P. griseofulvum* en salchichón. Se realizó la inoculación de salchichones elaborados de

forma tradicional mediante inmersión en una suspensión de esporas de *P. griseofulvum* o de *P. griseofulvum* junto con *P. chrysogenum*. El proceso de maduración fue de 21 días, con humedad relativa del 84% y temperatura de 12 °C. Para la cuantificación de ACP se tomaron muestras a los días 14, 17 y 21, que fueron analizadas mediante UHPLC-MS/MS [2]. El ensayo se realizó por triplicado.

Resultados y Discusión

D. hansenii no redujo la producción de ACP en el medio elaborado con salchichón (Fig. 1), a pesar de que la cepa evaluada ha mostrado previamente su capacidad para inhibir la producción de ocratoxina A (OTA) por *Penicllium verrucosum* y *Penicillium nordicum* en derivados cárnicos [1, 3]. Sin embargo, la concentración de ACP se redujo significativamente ($p \leq 0{,}01$) hasta valores inferiores al LOD (< 10 ppb) cuando *P. griseofulvum* se inoculó junto con *P. chrysogenum* o con los dos agentes conjuntamente (Fig. 1).

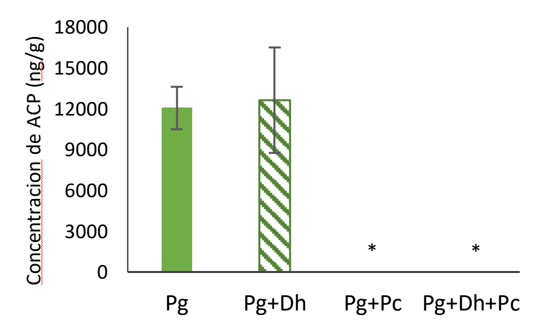


Figura 1: Producción de ácido ciclopiazónico (ACP) por *Penicillium griseofulvum* (Pg) en presencia de *Penicillium chrysogenum* (Pc) y *Debaryomyces hansenii* (Dh) en medio de cultivo elaborado con salchichón. *: Diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0{,}01$).

Debido a la actividad potencial *in vitro* mostrada por *P. chrysogenum* como agente bioprotector frente a *P. griseofulvum*, éste fue inoculado junto al moho toxigénico en salchichón. La concentración de CPA aumentó progresivamente a lo largo del periodo de incubación cuando *P. griseofulvum* se inoculó en ausencia del agente de biocontrol. Sin embargo, cuando se inoculó junto a *P. chrysogenum* la concentración de ACP se redujo significativamente ($p \leq 0{,}05$) en un 97,8% (Fig. 2), lo que concuerda con la reducción de la concentración de OTA mostrada previamente en jamón curado [4].

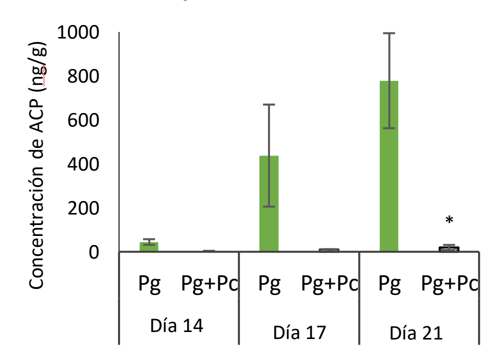


Figura 2: Producción de ácido ciclopiazónico (ACP) por *Penicillium griseofulvum* (Pg) en presencia de *Penicillium chrysogenum* (Pc) a los 14, 17 y 21 días de maduración de salchichón. *: Diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0{,}01$).

Conclusión

P. chrysogenum presenta actividad como agente bioprotector para controlar el peligro asociado a la producción de ACP por *P. griseofulvum* en derivados cárnicos curado-madurados.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, Junta de Extremadura y FEDER (AGL2013-45729-P, AGL2016-80209-P, GR15108). B. Peromingo es beneficiaria de una beca predoctoral (BES-2014-069484) del Ministerio de Economía y Competitividad.

REFERENCIAS

[1] Andrade, M.J, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2014,** *170*, 70-77.

[2] Peromingo, B., et al. *Food Chem.*, **2018**, *263*, 275-282.

[3] Peromingo, B., et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2018**, *268*, 73-80.

[4] Rodríguez, A., et al. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2015,** *609*, 23-928.

EFECTO DEL ORÉGANO EN EL CRECIMIENTO Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *Penicillium nordicum* EN UN SISTEMA MODELO DE SALCHICHÓN

Álvarez M.[1], Asensio M.A.[1], Delgado J.[1], Morcuende, D.[2], Andrade M.J.[1]
1 Universidad de Extremadura/Instituto de Investigación de Carne y Productos Cárnicos/Facultad de Veterinaria/[1]Higiene y Seguridad Alimentaria
2 Tecnología y Calidad de Alimentos. Avda. de las Ciencias s/n, Cáceres, España
mjandrad@unex.es

Resumen
La actividad antibacteriana de las especias empleadas en la elaboración de los embutidos curado-madurados es ampliamente conocida; sin embargo, su efecto antifúngico ha sido escasamente estudiado. En este trabajo se evaluó el efecto del orégano en el crecimiento de una cepa ocratoxigénica de *Penicillium nordicum* y la expresión de los genes *otapks* y *otanps*, relacionados con la síntesis de ocratoxina A (OTA), y los genes *Rho1* y *Hog1*, de respuesta al estrés. *P. nordicum* fue inoculado en un medio de cultivo elaborado con salchichón liofilizado y orégano, en presencia y ausencia de un compuesto antifúngico comercial. Como control negativo se utilizó el medio sin orégano ni compuesto antifúngico. La presencia del compuesto antifúngico, con o sin orégano, redujo la fase de latencia aunque no afectó a la velocidad de crecimiento. Además, la expresión de los genes *otapks* y *otanps* fue mayor en presencia del compuesto antifúngico, mientras que los genes de respuesta al estrés se encontraron inhibidos en su presencia. Por ello, el uso del orégano se plantea como una estrategia alternativa a los compuestos antifúngicos comerciales para controlar el peligro asociado a la presencia de OTA en los embutidos curado-madurados.

Introducción
Penicillium nordicum es una de las especies de mohos que mayor preocupación causa durante la maduración de los embutidos curado-madurados debido a su potencial ocratoxigénico. La ocratoxina A (OTA), además de representar un problema de seguridad alimentaria, es un inconveniente para la comercialización y exportación de los derivados cárnicos. Por otra parte, la demanda creciente por los consumidores de alimentos libres de aditivos sintéticos, como los compuestos antifúngicos comerciales comúnmente empleados en la industria cárnica, hace necesario buscar otras alternativas para el control de mohos ocratoxigénicos. La actividad antibacteriana de las especias habitualmente empleadas en la elaboración de los embutidos curado-madurados es ampliamente conocida, aunque su efecto antifúngico ha sido escasamente estudiado en la industria cárnica. Por ello, como objetivo de este trabajo se planteó evaluar el efecto del orégano en el crecimiento de una cepa ocratoxigénica de *P. nordicum*, así como en la expresión de genes que están implicados en la biosíntesis de OTA.

Material y Métodos
P. nordicum CBS 323.92 se cultivó en un medio elaborado con salchichón liofilizado (25%) y orégano (0,2%), sobre cuya superficie se depositó una porción de tripa adaptada al tamaño de las placas Petri. Como control positivo se añadió un preparado antifúngico con sorbato potásico y natamicina (Taberner, S.A.) y como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin orégano ni compuesto antifúngico. Al finalizar el periodo de

incubación durante 15 días a 12°C se calcularon la fase de latencia y la velocidad de crecimiento a partir de los diámetros de las colonias medidos cada 24h [1]. Además, se realizó la cuantificación relativa de la expresión de los genes *otapks* y *otanps*, relacionados con la biosíntesis de OTA [2], y los genes *Hog1* y *Rho1*, relacionados con la respuesta al estrés, que pueden estar implicados en dicha biosíntesis [3, 4].

Resultados y Discusión

La fase de latencia de *P. nordicum* se redujo respecto al control negativo debido a la presencia del preparado antifúngico comercial o a su combinación con orégano (Fig. 1). Sin embargo, la velocidad de crecimiento no se vio afectada significativamente por los tratamientos.

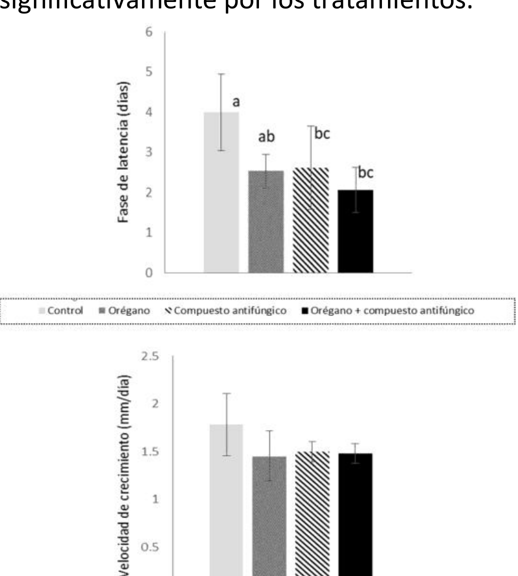


Figura 1: Efecto del orégano y el compuesto antifúngico comercial sobre la fase de latencia y velocidad de crecimiento de *P. nordicum* tras 15 días de incubación a 12°C. Diferencias significativas indicadas con distintas letras ($p \leq 0.05$).

El empleo de orégano o del compuesto antifúngico comercial dio lugar a una estimulación de los genes relacionados con la biosíntesis de OTA, siendo ésta menor en presencia de orégano (Fig. 2). Respecto a la expresión de los genes de respuesta al estrés, el orégano no dio lugar a diferencias significativas respecto al control negativo, mientras que se encontró inhibida significativamente en presencia del preparado antifúngico comercial (Figura 2).

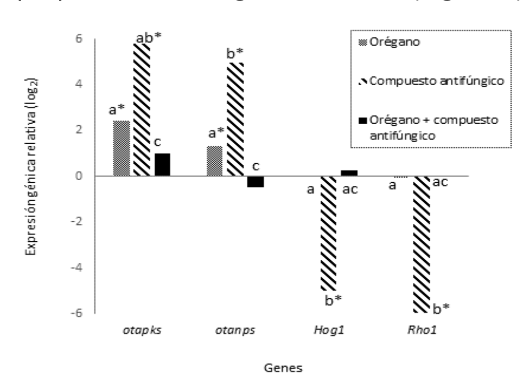


Figura 2: Efecto del orégano y el compuesto antifúngico comercial sobre la expresión génica relativa de *P. nordicum* tras 15 días de incubación a 12°C. Los resultados se expresan en log_2 respecto a su calibrador (control negativo, log_2=0). Diferencias significativas con las muestras control indicadas con asteriscos *y* entre tratamientos con distintas letras ($p \leq 0.05$).

La menor estimulación de la expresión de los genes de la ruta biosintética de OTA con orégano así como la ausencia de efecto sobre los genes de respuesta al estrés respecto al tratamiento con el compuesto antifúngico indican una actividad antagonista frente a la producción de OTA. Por ello, la adición de orégano se plantea como una estrategia alternativa al uso de compuestos antifúngicos comerciales para controlar el peligro asociado a la presencia de OTA. En futuros estudios, sería necesario relacionar los resultados obtenidos con la producción de OTA para determinar el efecto de la especia y el compuesto antifúngico.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por proyecto IB16045:



Fondo Europeo de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"



REFERENCIAS

[1] D. García, A.J. et al. *Food Microbiol.*, **2009**, *26*, 757–769.

[2] V. Bernáldez, et al. *Food Anal. Method.*, **2018**. DOI: 10.1007/s12161-018-1231-0

[3] A. Rodríguez, et al. *Food Microbiol.*, **2016**, *57*, 109-115.

[4] L. da Cruz Cabral, et al. *Int. J. Food Microbiol.*, **2018**, *275*, 17-23.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE *Physalis peruviana* L. CONTRA CEPAS DE *Salmonella* Spp. AISLADAS DE CARNES

Bayas-Morejón F., Tigre-León A., Ruilova M., Ramón Riveliño

Universidad Estatal de Bolívar/Centro de Investigación y Desarrollo Biotecnológico/ Departamento de Investigación/EC-020150, Guaranda (Ecuador).

fbayas@ueb.edu.ec

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos, Gram-negativos, móviles por flagelos peritoneales. *Salmonella* es una de las principales causas de enteritis bacteriana aguda en personas de todo el mundo [1]. La transmisión es típicamente alimenticia, pero también puede ocurrir al estar en contacto con una fuente ambiental contaminada por heces [2]. Él patógeno está asociado comúnmente con el ganado y aves de corral, aunque varias especies de vida silvestre también pueden servir como reservorios [3]. De acuerdo con los Centros de Control y Prevención de Enfermedades, *Salmonella* es el segundo patógeno más común que causaba intoxicaciones alimentarias y enfermedades durante 1998-2008 [4].

Para el desarrollo de este estudio, las bayas y hojas de *P. peruviana* fueron recolectadas desde mayo hasta diciembre de 2016 en Guaranda (Ecuador). Las bayas y las hojas fueron expuestas a maceración tanto en estado freso como liofilizadas durante 6 días en etanol a 96 GL, esto conforme el método establecido por Cakir *et al*. [5]. Los métodos para la obtención de extractos son mostrados en la tabla 1.

Tratamientos	Código
Bayas semi-maduras en fresco	BS-mFr
Bayas semi-maduras liofilizadas	BS-mLi
Bayas maduras en estado fresco	BmFr
Bayas maduras liofilizadas	BmLi
Hojas en estado fresco	HFr
Hojas liofilizadas	HLi

Tabla 1. Extractos utilizados en el estudio

Los extractos etanólicos se probaron frente a 32 aislados de *Salmonella* spp., obtenidas a partir de muestras de carne de consumo (ternera, cerdo y pollo) en la ciudad de Guaranda. Además, se utilizó como control la cepa *Salmonella arizonae* ATCC 13314.

El análisis de Actividad antimicrobiana fue mediante la aplicación del método de difusión disco-placa (Kirby-bauer), para lo que se humedecieron discos en blanco (TSM X 7215, Oxoid, UK) con los extractos de *physalis*, se utilizaron dos agentes antimicrobianos de uso clínico; gentamicina (CN) y ampicilina (AMP) (5 mg de cada). Se realizó una suspensión de cada cepa a escala 0,5 McFarland en placas de agar Muller-Hilton (7101A, Neogen, EE. UU) y tras 10 min de reposo, las placas fueron llevadas a incubación a 37°C durante 24 horas. Los diámetros de los halos de inhibición se midieron en milímetros, cada prueba fue realizada por triplicado. Finalmente, se realizó un analisis estadístico utilizando el software Infostat.

Los resultados revelaron que los extractos presentan un efecto antibacteriano de diferente magnitud, dependiendo del tipo de extracto. El diámetro de la zona de inhibición de los extractos de *P. peruviana* varió de 8 a 26 mm. El extracto con mayor efectividad antimicrobiana fue el BmFr con 90,63% de los aislados inhibidos, seguido por el extracto HLi con 78,13% (Figura 1).

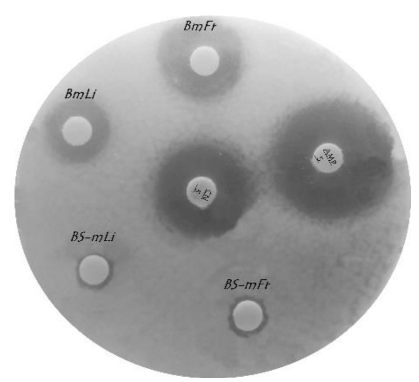


Figura 1: Halos de inhibición

Todos los extractos resultaron estadísticamente diferentes (P 0.001) en el efecto de inhibición de los aislados y cepa control probados.

El extracto BmFr presentó mayor efectividad, de hecho, el tamaño del halo fue mayor o igual a 8 mm en 14 de los aislados, de los cuales, 6 de 11 provinieron de carne de ternera; 2 de 9 de pollo y 6 de 12 de cerdo; por otro lado, en la cepa de control presentó un halo de 10 mm de diámetro. El segundo extracto que mostró efectividad en el análisis fue BmLi con 12 aislados inhibidos donde los tamaños de halo fueron mayores o iguales a 8 mm, de los cuales, 4 de 11 provinieron de carne de ternera, 3 de 9 carne de pollo y 5 de carne de cerdo.

El extracto de HLi a pesar de tener un número considerable de aislados inhibidos (25/32), los tamaños de halo eran en menores de 8 mm. Los demás extractos no mostraron inhibición. En los antibióticos de uso clínicos, con gentamicina, 30 de los 32 aislados (93,75%) y el control resultaron ser resistentes a este antibiótico (el tamaño del diámetro del halo fue ≤12 mm, según el CLSI, (2012), solo 1 aislado de la carne de ternera mostró resistencia intermedia, y una de cerdo presentó susceptibilidad.

Por otro lado, después de aplicar discos de ampicilina, 31 de 32 aislamientos (96,88%) incluyendo el control mostraron resistencia (diámetro del halo ≤13 mm, según el CLSI, (2012), solo un aislado de carne de cerdo mostró resistencia intermedia (I) a este antibiótico.

Curiosamente, los mismos dos aislados que mostraron ser susceptibles a los dos antibióticos estudiados mostraron resistencia intermedia y susceptibilidad a los dos mejores extractos de *P. peruviana* L BmFr y BmLi.

Los resultados permiten concluir que los extractos de *Physalis peruviana* L podrían ser utilizados como antibióticos naturales para el tratamiento de enfermedades en especial las causadas por *Salmonella* y podrían ser útiles para comprender la relación entre las curas tradicionales y la medicina actual.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento al Departamento de Investigación de la UEB y al programa de canje de deuda Ecuador-España por el financiamiento de esta investigación.

REFERENCIAS

[1] CLSI, Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20. Grebo. **2012**, Capítulo 3: 6-8.

[2] E Scallan, R Hoekstra, F Angulo, R Tauxe, M Widdowson, S Roy, P Griffin. *Emerg Infect Dis*, **2011**, *17*, 7–15.

[3] K Cummings, L Rodriguez-Rivera, M Grigar, S Rankin, B Mesenbrink, B Leland, M Bodenchuk. *Zoonoses and Public Health*, **2016**, *63*, 436–441.

[4] L Gould, K Walsh, A Vieira, K Herman, I Williams, A Hall, D Cole. *Morb Mortal Wkly Rep*, **2013**, CDC. *62* (SS02), 1-34.

[5] O Cakir, M Pekmez, E Cepni, B Candar, K Fidan. *Food Sci Technol (Campinas),* **2014**, *34* (2), 422-430.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE PREPARADOS CÁRNICOS

Castaño-Arriba A.[1,2], Capita R.[1,2], Alonso-Calleja C.[1,2]
1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana s/n, 24071, León, España.
2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León. Calle La Serna nº 58, 24007, León, España.
carlos.alonso.calleja@unileon.es

Introducción

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en los alimentos supone un importante peligro tanto directo como indirecto, en este último caso ante la posibilidad de transferencia horizontal de los determinantes de resistencia hacia bacterias patógenas [1]. Por su elevada capacidad de transferencia horizontal de genes de resistencia, las enterobacterias son microorganismos centinela de resistencia a antibióticos [2, 3, 4]. La carne y productos cárnicos tienen un alto consumo en España, donde, en 2016, se consumieron 37,11 kg per cápita de estos alimentos [5]. Ese mismo año, se registraron en la Unión Europea 515 brotes de enfermedad transmitida por alimentos, de los cuales el 24,4% fueron provocados por carne y productos cárnicos. La carne de pollo fue el origen de un elevado número de brotes (23) [6].

El objetivo de este estudio ha sido determinar el patrón de resistencia a antibióticos de 100 cepas de enterobacterias aisladas de 20 muestras de diferentes tipos de preparados cárnicos adquiridos en la ciudad de León (España).

Material y Métodos

Se adquirieron, en diversos supermercados de León, 20 muestras de preparados cárnicos (hamburguesas, albóndigas, *nuggets*, carne picada y salchichas) de vacuno, cerdo, pollo y pavo. Las muestras se homogenizaron en agua de peptona (Oxoid) al 0,1% y se realizaron diluciones decimales. Se sembró en profundidad en medio VRBGA (Oxoid), con adición de sobrecapa. Las placas se incubaron a 35ºC durante 24 horas. Se tomaron un total de 100 colonias (aproximadamente cinco de cada muestra) con morfología típica de enterobacterias. Las cepas se conservaron en viales de caldo triptona de soja (TSB, Oxoid), suplementado con un 20% (vol/vol) de glicerol y se almacenaron a -50ºC.

A partir de los viales conservados en congelación, se sembraron tubos con 5 mL de TSB, que se incubaron durante 24 horas a 35ºC. Posteriormente, las cepas se sembraron por estría sobre agar para recuento en placa (PCA, Oxoid), que se incubó durante 24 horas a 35ºC. Estas placas se utilizaron para realizar las pruebas que se indican a continuación.

Para la identificación de las cepas se realizaron dos pruebas preliminares: oxidasa y la catalasa. Las cepas catalasa positiva y oxidasa negativa se identificaron a nivel de especie con ayuda de galerías API 20 E (bioMérieux). Para la interpretación de los perfiles numéricos obtenidos se utilizó el software de identificación apiweb™ (API 20E V5.0).

Para la realización de los antibiogramas se sembró una colonia de cada placa en un tubo con 5 mL de TSB. Los tubos se incubaron a 30ºC durante 18 horas. Para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos se realizó la técnica de difusión por disco en agar Mueller-Hinton (MHA,

Oxoid) para un total de 15 antimicrobianos. Los discos de antibióticos (Oxoid) utilizados fueron: amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, ampicilina, aztreonam, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, ácido nalixídico, estreptomicina, sulfametoxazol/trimetoprim y tetraciclina. Tras la colocación de los discos de antibióticos, las placas se incubaron 24 horas a 30ºC. Se midieron los halos de inhibición y se determinaron las cepas sensibles o resistentes según los criterios del CLSI [7].

Resultados y Discusión

Las especies predominantes fueron *Escherichia coli* (33% de los aislamientos), *Enterobacter* spp. (12%), *Klebsiella* spp. (12%), *Hafnia alvei* (11%) y *Serratia* spp. (11%). Los porcentajes de cepas multirresistentes (a dos o más antibióticos), resistentes a un antibiótico y sensibles, fueron 66%, 24% y 10%, respectivamente. Por grupos microbianos, el porcentaje de cepas multirresistentes osciló entre el 25% (*Escherichia vulneris*) y el 90,9% (*Hafnia alvei*) (Figura 1).

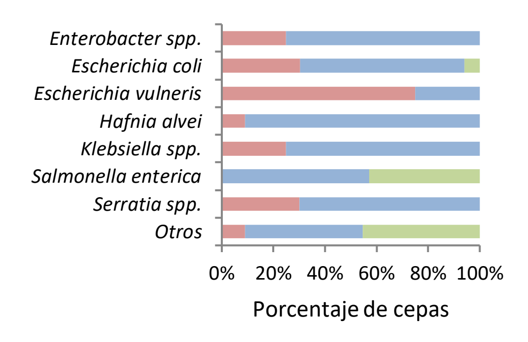


Figura 1: Proporción de cepas resistentes de cada especie bacteriana. La barra roja representa el porcentaje de cepas con resistencia a un antibiótico, la barra azul el porcentaje de cepas con resistencia a dos o más antibióticos y la barra verde el porcentaje de cepas sensibles a todos los antibióticos.

Los mayores porcentajes de cepas resistentes se observaron frente a ampicilina (51%) y amoxicilina/ácido clavulánico (47%). Todas las cepas procedentes de preparados de carne de pavo y de vacuno fueron resistentes o multirresistentes. Las cepas procedentes de carne de pollo fueron las que menos resistencias mostraron. Se observó un alto porcentaje de cepas presuntas *Salmonella enterica* en vacuno (7,69%), cerdo (22,22%) y pollo (8,47%).

Conclusión

Estos resultados subrayan la necesidad de una buena manipulación de los preparados cárnicos para evitar la diseminación de cepas resistentes o genes de resistencia.

AGRADECIMIENTOS

Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA; RTA2014-00045- C03-02), Consejería de Educación (JCyL) y Plan Operativo de Empleo Juvenil (Fondo Social Europeo e Iniciativa de Empleo Juvenil, YEI).

REFERENCIAS

[1] R. Capita, C. Alonso-Calleja. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2013**, *53*(1), 11-48.

[2] D. Molina-González, C. Alonso-Calleja, A. Alonso-Hernando, R. Capita. *Food Control*, **2014**, *40*(1), 329-334.

[3] R. Capita, E. Álvarez-Fernández, E. Fernández-Buelta, J. Manteca, C. Alonso-Calleja. *Food Microbiol.*, **2013**, *34*(1), 112-117.

[4] E. Álvarez-Fernández, C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández, R. Capita. *Int. J. Food Microbiol.*, **2012**, *153*(3), 281–287.

[5] MAPAMA. Informe del consumo de alimentación en España **2016**. *CPAGE*, 2017, 225 pp.

[6] EFSA-ECDC.

[7] *EFSA J.*, **2017**, *15*(12):5077, 228 pp.

[8] CLSI. Performance standards for antimicrobial suceptibility testing. 28ª edición. *CLSI supplement*, **2018**, M100S.

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS PERSISTENTES DE *Listeria monocytogenes* EN INDUSTRIAS DE PROCESADO DE PRODUCTOS CÁRNICOS

García-Lafuente Ana[1], D'Arrigo Matilde[1], Mateo-Vivaracho Laura[1], Guillamón Eva[1], Fernández-León Mª Fernanda[1], Medina Margarita[2]

1 Centro para la Calidad de los Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Soria, España.

2 Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Madrid, España.

garcia.ana-maria@inia.es

Introducción

L. monocytogenes representa un problema grave para la industria alimentaria debido a la dificultad de su control en las plantas de procesado. Se encuentra en superficies de la industria, suelos, sumideros, equipos y zonas refrigeradas, que son sometidas rutinariamente a procesos de limpieza y desinfección. Las cepas persistentes de *L. monocytogenes* se aíslan con más frecuencia de los ambientes de procesado que de las materias primas. La detección de cepas persistentes del ambiente y equipos tras la limpieza y desinfección pone de relieve el riesgo de crecimiento y establecimiento de una determinada cepa, particularmente en zonas de difícil acceso, incrementando el riesgo de contaminación del producto.

Algunos subtipos de *L. monocytogenes* pueden persistir durante meses o años y parecen característicos de cada planta, lo que obliga a establecer medidas de control dirigidas a estas cepas específicas. Los métodos de identificación permiten caracterizar los subtipos y grupos clonales de *L. monocytogenes*. La serotipificación constituye el primer nivel de diferenciación de cepas del patógeno, clasificándolo en los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b. Para completar el tipado de cepas y caracterizar la contaminación, el método más utilizado en los estudios de ecología y trazabilidad de *L. monocytogenes* es la electroforesis en campo pulsante (PFGE) del digerido obtenido con las endonucleasas de restricción *Asc*I y *Apa*I [1]. Mediante su aplicación es posible trazar las cepas o subtipos de *L. monocytogenes* presentes en las industrias. En el presente trabajo se ha llevado a cabo el serotipado y genotipado de las distintas cepas aisladas a partir de muestras de ambiente y superficie de industrias cárnicas españolas de procesado de jamón, recogidas durante dos años.

Muestreo. Se realizaron muestreos en 10 empresas durante dos años. Se tomaron muestras de ambiente y superficies (2 muestreos/año), analizando un total de 1801 muestras de superficie repartidas entre zonas de contacto (C, 41%) y de no contacto (NC, 59%) así como de antes (S, 61%) y después de la limpieza y desinfección (L, 39%).

Metodología. La detección y aislamiento de *L. monocytogenes* se realizó mediante enriquecimiento selectivo según el protocolo USDA-FSIS. A partir de las muestras positivas se aislaron dos colonias de cada una y se procedió a su serotipado mediante PCR multiplex. Se utilizaron 4 pares de cebadores específicos para los 4 serotipos principales de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) y un par específico para *Listeria* spp [2]. Se genotiparon 455 aislados por PFGE, los perfiles de restricción obtenidos con *Apa*I y *Asc*I mediante PFGE se analizaron con el

software BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), obteniéndose distintos pulsotipos. Los pulsotipos persistentes encontrados en cada empresa se compararon entre sí para identificar cuáles de ellos correspondían al mismo.

Resultados

Del total de 1801 muestras analizadas, 350 (19,4%) resultaron positivas, con una distribución entre muestras recogidas antes de la limpieza (S) y después (L) y en zonas de contacto (C) y no contacto (NC) que se muestra en la Tabla 1.

	Muestras positivas			
	L	S	C	NC
Año 1	45	137	94	88
Año 2	33	135	91	77
Total	78	272	185	165

Tabla 1: Distribución de muestras positivas para *L. monocytogenes.*

Se encontraron los 4 serotipos que permite identificar el ensayo (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b), siendo el 1/2a claramente mayoritario en prácticamente todas las empresas. Los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b causan más del 90% de los casos de listeriosis en el hombre. De ellos, una proporción alta de los brotes de listeriosis asociados con alimentos son causados por cepas del serotipo 4b, que es menos frecuente en las plantas de procesado. En las muestras analizadas, los serotipos más abundantes fueron 1/2a con un 53,9% de los aislados y 1/2c con un 26,0%. Al serotipo 1/2b pertenecían el 15,3% de los aislados y solamente un 4,8% fue 4b.

La identificación de los genotipos de los aislados mediante PFGE permite localizar los focos más concretos de contaminación y realizar la trazabilidad de la contaminación a lo largo de la empresa, así como identificar las cepas más persistentes. El número de pulsotipos distintos encontrados en cada una de las empresas fue muy diferente (Tabla 2), desde 6 en la empresa que mostró menor variabilidad hasta 25 en la que fue mayor. El número de aislados por pulsotipo, también fue muy variable, de manera que muchos de ellos presentaron un solo aislado. Los pulsotipos que presentaron el 10% de los aislados e identificados en muestras recogidas a lo largo de los dos años de estudio se consideraron persistentes.

Empresa	*Aislados*	*Pulsotipos*	*Persistentes*
A	53	25	3
B	73	22	2
C	75	14	6
D	36	10	2
E	22	6	2
F	38	12	5
G	48	12	5
H	47	20	2
I	9	9	-
J	54	12	2

Tabla 2: Distribución de los aislados de cada empresa en pulsotipos.

La comparación de los pulsotipos persistentes encontrados permitió la identificación de dos de ellos comunes en varias empresas. Dichos pulsotipos fueron detectados en distintas zonas a lo largo de la cadena de procesado tanto en muestras recogidas antes como después de la limpieza y desinfección.

Conclusiones. Los sistemas actuales de limpieza y desinfección no son suficientemente eficaces para la eliminación de *L. monocytogenes* de las plantas de procesado de productos cárnicos curados. Se han encontrado pulsotipos que se mantienen a lo largo de dos años y que aparecen en distintas empresas. El estudio de estas pulsotipos persistentes permitirá el diseño de nuevas estrategias de eliminación dirigidas específicamente a estas cepas persistentes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AT2013-003, en el marco de Listeria Cero.

REFERENCIAS

[1] K Aarnisalo, et al. *J Food Prot*, **2003,** *66*, 249-55.
[2] M Doumith, et al. *J Clin Microbiol,* **2004**, *42*, 3819-22.

PRODUCT-ORIENTED APPROACH TO EXTEND THE SHELF-LIFE OF COOKED SAUSAGES BY ANTIMICROBIALS AND HIGH PRESSURE PROCESSING

Garriga M., Serra X., Bover-Cid S., Jofré A.
IRTA-Food Safety Programme. Finca Camps i Armet s/n, 17121 Monells (Girona)
anna.jofre@irta.cat

Introduction
Frankfurter-type sausages are perishable cooked meat products that due to their physicochemical properties, i.e. high water activity (a_w) and pH close to neutrality, are highly perishable. Shelf-life of cooked sausages, although being a pasteurized product, can be shortened by post-processing contamination with lactic acid bacteria (LAB), which can grow and spoil the product during storage even at refrigeration temperature.

Objective
The objective of the present study was to evaluate the inhibitory effect of natural antimicrobials and high pressure processing (HPP) on LAB during refrigerated storage of cooked sausages by a challenge testing approach.

Material and Methods
Smoked and non-smoked cooked sausages formulated without or with antimicrobials applied in batter (lactate/diacetate batch and distilled vinegar batch) or on surface (spice extract batch) were inoculated with *Lactobacillus curvatus* CTC1755 at 10^2 cfu/g for the shelf-life study and at 10^6 cfu/g for the HPP lethality study. Vacuum packaged sausages were treated by HHP at 600 MPa for 5 min or not treated, and stored at 5.5°C for up to 52 days depending on the batch. Growth of LAB was monitored throughout shelf-life by plate counting in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar at selected sampling times. Growth rate was estimated by mathematical modelling (DMFit Excel add-in from ComBase based on Baranyi and Roberts, 1994 equation ([1]). Growth rate at different temperatures was estimated by simulation using the Ratkowsky root-square equation secondary model [2].

Results
The growth rate of *L. curvatus* was lower (up to 67%) in smoked than in non-smoked sausages which would be related to the inhibitory effect of smoke. All the assayed antimicrobials reduced the growth rate of *L. curvatus*. The surface application of the spice extract was the most effective treatment from the microbiological point of view, however, it was not appropriate at the sensory level. The shelf-life extension of sausages by the two antimicrobials applied in the meat batter (lactate/diacetate and distilled vinegar) was similar. The commercial shelf-life of cooked sausages can be estimated as the time required by the LAB to reach 10^7 cfu/g. Considering initial LAB levels of 1 cfu/100 g, smoked sausages formulated with lactate/diacetate would have the largest shelf-life at 3 ºC (97 days) which represents a 1.2-fold increase when compared smoked sausages without antimicrobials. In non-smoked sausages, the largest shelf-life was also achieved with the application of lactate/diacetate. In this case the shelf-life was shorter (84 days) but the increase when compared with the non-smoked sausages formulated without antimicrobials was higher (1.5-fold). When the hygienic quality of sausages is lower, (i.e. initial

levels of LAB of 1 and 100 ufc/g) the shelf-life of both smoked and non-smoked sausages is shortened (Figure 1).

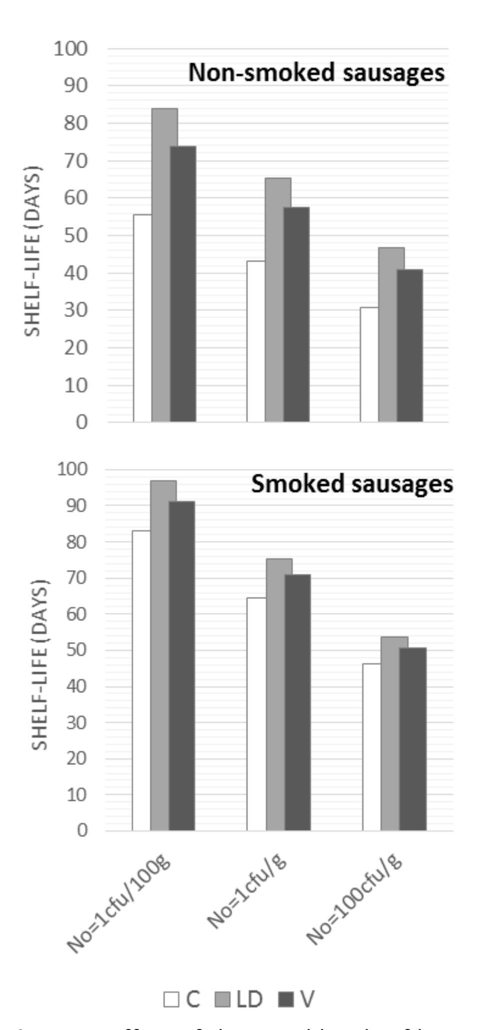


Figura 1: Effect of the initial levels of lactic acid bacteria on the shelf-life of non-smoked and smoked sausages stored at 3 ºC. Shelf-life was estimated as the days required by the LAB to reach 10^7 cfu/g.

HPP drastically reduced the levels of *L. curvatus* and extended the shelf-life in all the batches of cooked sausages, especially in non-smoked ones where LAB remained below the limit of detection (1 cfu/g) until day 22.

Conclusions

The use of a product-oriented approach is essential when exploring different strategies to extend shelf-life as interaction between intrinsic and extrinsic factors can lead to unexpected outcomes.

ACKNOWLEDGEMENTS

CDTI Centro para el Desarrollo Tecnologico Industrial (CDTI) project 96813. Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitivity.

REFERENCES

[1] Baranyi, J. & T. A. Roberts. *Int. J. Food Microbiol*. **1994**, *23*:277-294.

[2] Ratkowsky, D. A., J. Olley, T. A. McMeekin & A. Ball. *J. Bacteriol.* **1982**, 149:1-5.

EFECTO DEL pH Y DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITO EN LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Hospital X.F., Temprano L., Hierro E., Fernández M., García de Fernando G.D.
Universidad Complutense/Facultad de Veterinaria/Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología de los Alimentos. Av. Puerta de Hierro S/N. 28040 Madrid.
mingui@ucm.es

Texto resumen. Se ha estudiado el efecto combinado del pH y de la concentración de nitrito en la tasa específica máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Para ello se analizó el crecimiento del microorganismo en un intervalo de condiciones que pueden darse habitualmente en los embutidos crudos curados, como el fuet o el salchichón.
L. monocytogenes se incubó en caldo de soja tripticasa a 20 ºC, pHs 5,5 y 6,0, y con distintas concentraciones de nitrito sódico (150 ppm, 75 ppm, 50 ppm 25 ppm y 0 ppm). Se comprobó que, al reducir la concentración de nitrito en el medio de cultivo, la velocidad de crecimiento aumentaba. Asimismo, la bacteria se multiplicaba más lentamente cuando crecía a un pH más ácido, indicando el posible riesgo microbiológico cuando se modifican ambos parámetros.

Las tendencias actuales de consumo se orientan hacia una creciente demanda de alimentos mínimamente procesados y con un contenido reducido de aditivos en su composición. Uno de los aditivos habituales de los productos cárnicos crudos curados son las sales nitrificantes, cuya relación con la formación de nitrosaminas es de sobra conocida [1]. Por tanto, no es de extrañar que se pretenda disminuir su concentración en los alimentos o, incluso, su completa eliminación. Pero, la eliminación total o parcial de estas sales puede comprometer la seguridad microbiológica de estos y otros alimentos, ya que los nitritos, además de contribuir a la formación del color y aroma característicos de los embutidos crudos curados y tener un efecto antioxidante, son antimicrobianos.

Listeria monocytogenes es un microorganismo muy ubicuo, capaz de crecer a temperaturas entre 1 y 45 ºC, pHs entre 4,6 y 9,6 y a_w superiores a 0,90. En los embutidos, los microorganismos patógenos como *Listeria* se inhiben merced al efecto combinado de varios factores, como la temperatura de almacenamiento, el pH, la a_w, la microbiota competitiva o la concentración de nitrito. Cualquier cambio en estos parámetros podría favorecer la multiplicación de este microorganismo. En este sentido, se ha observado que *L. monocytogenes* puede crecer en los embutidos con un contenido reducido en sales nitrificantes, sobre todo durante los primeros días del proceso de maduración, cuando las condiciones de pH y a_w son más favorables para su desarrollo [2].

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto combinado de la concentración de nitrito de sodio y del pH en un sistema modelo en la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}) de *L. monocytogenes*. Para ello se prepararon 5 soluciones distintas de caldo de soja tripticasa (TSB) (Pronadisa) con diferentes concentraciones de nitrito sódico (150 ppm -cantidad máxima permitida actualmente en la Unión Europea para los embutidos-, 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm y 0 ppm). Cada solución se ajustó a pHs 6,0 y 5,5 con ácido láctico al 85 %.

Para la determinación de la μ_{max}, una suspensión de *L. monocytogenes* (CECT 5672/Scott A) se diluyó en el mismo medio en el que se incubó posteriormente, hasta obtener varias concentraciones estimadas entre 10^5 y 10^1 ufc/ml. Para cada dilución se realizaron de 3 a 7 réplicas en función de la dilución del inóculo (a mayor dilución, mayor número de réplicas). Finalmente se añadieron 300 µl de las suspensiones en los pocillos de 2 placas de Bioscreen C (Labsystems), equipo que permite registrar de forma indirecta el crecimiento bacteriano mediante la medida de la absorbancia (turbidez) del medio a 420 – 580 nm, en 200 muestras de forma simultánea. Las muestras se incubaron a 20 ºC, temperatura típica de fermentación de los embutidos crudos curados, durante los primeros días de su elaboración. Para conocer el número exacto de microorganismos presentes en cada dilución se realizaron recuentos en placas de agar de soja tripticasa (TSA) (Pronadisa) incubadas a 37 ºC durante 24h.

En la figura 1 se muestran los valores de μ_{max} para cada una de las concentraciones de nitrito de sodio y para cada uno de los pHs (6,0 y 5,5). Como se puede observar, la concentración de nitrito influyó en el crecimiento de *L. monocytogenes*, de modo que, a medida que se reducía su concentración en el medio, mayor fue la velocidad de crecimiento del microorganismo. Así pues, comparando los lotes extremos (150 ppm y 0 ppm), se observa una diferencia de μ_{max} de 0,7 h^{-1} entre ellos, independientemente del pH del medio. Otros autores han observado un efecto inhibidor similar del nitrito en *Listeria*, en ensayos in vitro [3].

En cuanto al efecto del pH sobre el crecimiento de *Listeria*, como era de esperar, se confirma que la acidificación del medio de cultivo ralentiza la multiplicación del microorganismo. Concretamente, comparando las rectas de regresión obtenidas para ambos pHs se aprecia una reducción de la μ_{max} de 0,13 h^{-1} al disminuir el pH de 6,0 a 5,5, con independencia de la concentración de nitrito. Los pHs que se han estudiado en este trabajo se aproximarían a los valores iniciales en la fórmula de un producto picado crudo curado y a los de un producto de baja acidez tras la maduración (pH 6,0), y a los valores de un producto crudo curado fermentado (pH 5,5).

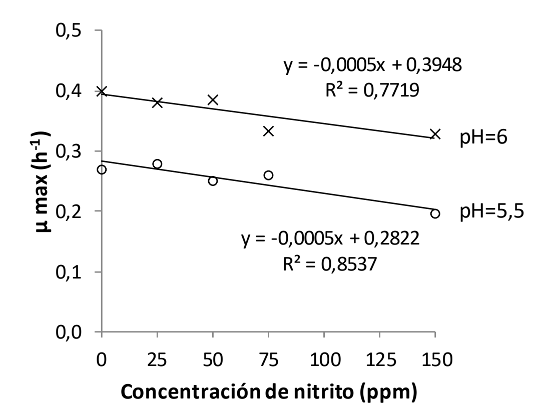


Figura 1: Efecto de la concentración de nitrito y del pH en la la μ_{max} de *L. monocytogenes* (CECT 5672/Scott A) en TSB a 20ºC

En conclusión, la posible reducción de la concentración de nitritos en un embutido crudo curado entraña riesgos microbiológicos que han de evaluarse con sumo cuidado antes de tomar semejante medida y siempre ha de acompañarse de un control exhaustivo del pH del producto.

REFERENCIAS

[1] M Habermeyer, A Roth, S Guth, P Diel, KH Engel, B Epe et al., *Mol Nutr Food Res,* **2015**, *59*, 106-128.

[2] XF Hospital, E Hierro, M Fernández, *Int J Food Microbiol*, **2012**, *153*, 395-401.

[3] GW Gould, JEJ Corry, "Microbial growth and survival in extremes of environment" (Academic Press, 1980).

COMPORTAMIENTO DE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN JAMÓN CURADO LONCHEADO

Pérez-Boto D., Pérez-Baltar A., Bravo D., Medina M.
INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria). Departamento de Tecnología de Alimentos. Ctra A Coruña km 7.5, 28040 Madrid
perez.boto@inia.es

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena tolerante al NaCl, pudiendo crecer en alimentos como el jamón curado loncheado. En el presente trabajo se comprobó el crecimiento de *S. aureus* INIA2014/15 procedente de jamón curado, inoculada en jamón loncheado con distintas a_w (0,897, 0,926, 0,943 y 0,955). A 8 y 12ºC apenas se registró crecimiento, mientras que a 22 y 30ºC los niveles dependían de la a_w, alcanzándose en jamón con a_w de 0,955 valores de 7,67 log tras 7 d a 22ºC y de 8,52 log tras 7 d a 30ºC, una población bacteriana suficiente para la producción de enterotoxina en el jamón. Este estudio muestra como el jamón curado loncheado contaminado por *S. aureus* es una fuente potencial de toxiinfección alimentaria cuando la a_w y la temperatura de conservación favorecen su crecimiento.

Introducción

S. aureus es causante de intoxicaciones alimentarias de diversos orígenes, entre ellos los productos cárnicos[1]. Crece en un amplio intervalo de temperaturas (7-48ºC), pH (4,2-9,3), concentraciones de sal (hasta 15%) y actividad de agua (a_w) (>0,83)[2]. La contaminación con estafilococos se atribuye a una manipulación inadecuada más un almacenamiento en condiciones de abuso de temperatura. Además, en la Unión Europea existe preocupación por cepas de *S. aureus* de origen porcino que también podrían llegar al producto final, en especial, cepas de tipo MRSA (Clonal Complex 398)[3].

Las operaciones de deshuesado, troceado y/o loncheado del jamón curado pueden dar lugar a la contaminación con *S. aureus*. El producto puede considerarse seguro si se conserva en refrigeración y cuando sus características fisicoquímicas, y en particular la a_w, se mantengan dentro de unos parámetros determinados. Sin embargo, valores de a_w superiores a 0,90 pueden permitir su multiplicación y la producción de enterotoxinas si estos productos se distribuyen y/o almacenan sin refrigeración. El jamón curado con una a_w < 0,90 puede considerarse seguro[4] incluso si se almacena sin refrigeración.

El objetivo del presente trabajo fue conocer el comportamiento de distintos aislados de *S. aureus* en jamón curado loncheado con distinta a_w y mantenido a distintas temperaturas.

Materiales y Métodos

Inicialmente se inocularon 7 aislados de *S. aureus* (M1, ND1, INIA2014/15M+, INIA2014/15M-, ST1, ST101 y ST398) procedentes de jamón curado a aproximadamente 10^3 ufc/g en jamón loncheado con a_w 0,91 manteniéndose en condiciones de abuso de temperatura (22 y 30ºC) durante 7 d. Los recuentos se realizaron en agar Baird-Parker incubado a 37ºC durante 48 h.

Para comprobar el crecimiento a distintas a_w se seleccionó el aislado que alcanzó mayores niveles y se inoculó en jamón curado loncheado con valores de a_w de 0,897, 0,926, 0,943 y 0,955 que se mantuvo

durante 7 d a 8, 12, 22 y 30ºC. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resultados

Se comprobó el mayor crecimiento del aislado INIA2014/15M+, con valores de 4,39 ±0,2 log a 22ºC y 7,33±0,9 log a 30ºC (Figura 1).

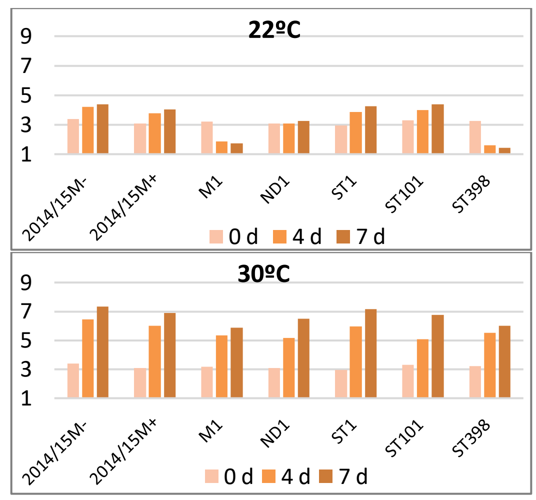


Figura 1: Crecimiento de distintos *S. aureus* (log ufc/g) en jamón loncheado mantenido 7 d a 22 y 30ºC.

Se seleccionó dicha cepa para los ensayos a distintas a_w y temperaturas de conservación.

A 8 y 12ºC, los recuentos fueron similares en todos los jamones (Tabla 1).

a_w	8ºC	12ºC
0,897	4,26±0,01	3,61±0,14
0,926	4,18±0,16	4,09±0,06
0,943	4,13±0,24	3,91±0,11
0,955	3,92±0,02	3,91±0,06

Tabla 1: Recuentos obtenidos (log ufc/g) tras 7 d a 8 y 12ºC en diferentes a_w.

Por otra parte, se observó que a 22 y 30ºC (Figura 2) los niveles dependían de la a_w. En jamón con una a_w de 0,955 a 30ºC se alcanzaron 8,52±0,04 log ufc/g, mientras que con una a_w de 0,897 a la misma temperatura los valores de *S. aureus* fueron de 4,93±0,7 log ufc/g. Por tanto, con valores de a_w alta, los niveles alcanzados podrían dar lugar a la producción de enterotoxinas.

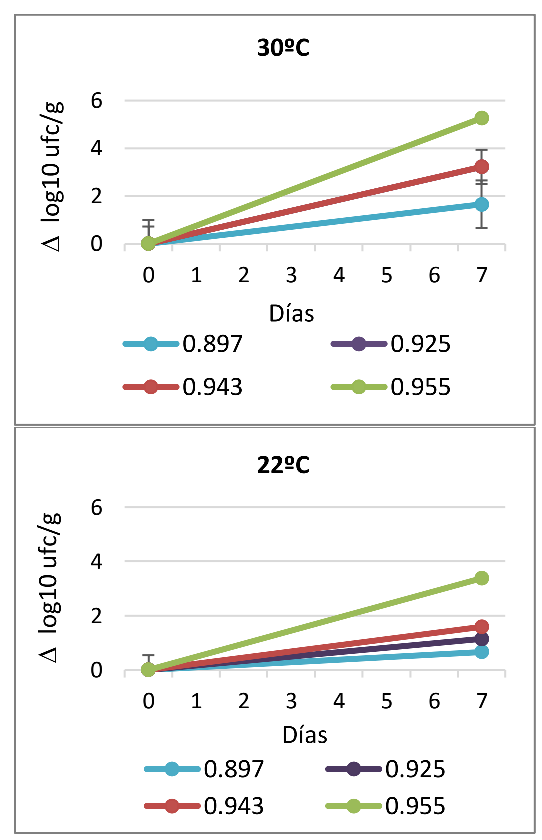


Figura 2: Comportamiento de *S. aureus* (Δlog ufc/g) en muestras tras 7 d a 22 y 30 ºC.

Conclusiones

Este estudio muestra como el jamón curado loncheado contaminado por *S. aureus* es una fuente potencial de toxiinfección alimentaria cuando la a_w y la temperatura de conservación favorecen su crecimiento.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto RTA2013-00070-C03-01 (MINECO).

REFERENCIAS

[1] Kadariya J, T C Smith, D Thapaliya. *BioMed Res Int*, **2014**, Article ID 827965, 9 pages.

[2] M A Argudin, M C Mendoza, M R Rodicio. *Toxins,* **2010,** 1751-1773.

[3] EFSA and ECDC. *EFSA J.* **2018**, 16(2), 270 pages.

[4] F Untermann, C Müller. *Int J Food Microbiol,* **1992,** 109-115.

DISEMINACIÓN DE SUPERBACTERIAS: ESTUDIO DE LA CAPACIDAD CONJUGATIVA DE *E. COLI* BLEES AISLADAS DE ALIMENTOS, AGUAS Y GRANJAS

Pérez-Etayo L.[1], González D.[1,2], Vitas A.I.[1,2]
1 Departamento interfacultativo de Microbiología y Parasitología, Universidad de Navarra. C/Irunlarrea s/n, 31008, Pamplona.
2 IDISNA. Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra. Pamplona.
lperez.13@alumni.unav.es

Introducción

El elevado uso de antibióticos en clínica humana y en veterinaria ha dado lugar a un aumento de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) en el ambiente extrahospitalario (entorno animal, alimentos, y ecosistemas acuáticos, entre otros), convirtiendose así en uno de los mayores poblemas de salud pública [1,2]. Por ello, uno de los principales retos al que nos enfrentamos es el de frenar la dispersion de estas resistencias en todos los ámbitos. Para comprender los mecanismos de diseminación de estas bacterias es necesario estudiar la capacidad de transmisión horizontal de genes de resistencia de unas bacterias a otras.

Así, el objetivo de este estudio ha sido determinar la capacidad conjugativa de cepas de *E. coli* productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas de distintos entornos en la Comunidad Foral de Navarra.

Material y Métodos

Se estudiaron 50 cepas de *E. coli* productoras de BLEE aisladas de alimentos (*n*=21), aguas de ríos (*n*=8), depuradoras [EDAR] (*n*=13) y granjas (*n*=8). Como cepa receptora se utilizó *E. coli* AB1157, carente de plásmidos, resistente a la estreptomicina y sensible a ampicilina.

A partir de cultivos frescos de las cepas en BHI (24 h, 37ºC), se mezclaron donadora y receptora en proporción 1:1 (5 ml de cada una) y se llevó a incubar a 37ºC durante 24 h. Los transconjugantes se seleccionaron en placas de TSA suplementadas con estreptomicina (100 µg/ml) y ampicilina (30 µg/ml). La frecuencia de conjugación se calculó como la relación entre el número de transconjugantes y el de células donadoras.

La caracterización molecular de los transconjugantes se realizó mediante amplificación por PCR de los genes implicados en las resistencias (bla_{CTX-M}, y bla_{TEM}) [3,4].

Resultados y Discusión

El 100% de las cepas analizadas fueron capaces de realizar una transferencia génica eficaz, volviéndose la cepa receptora resistente a ampicilina.

La Tabla 1 representa la media de las frecuencias de conjugación según el origen de las cepas. Las cepas con mayor frecuencia conjugativa fueron las aisladas de entornos acuáticos, con valores entre 10^{-1} y 10^{-2} (EDAR y ríos, respectivamente), a diferencia de las cepas de granjas y alimentos que mostraron frecuencias con una media de 10^{-4}.

Origen cepas	Frecuencia conjugación
Alimentos (A)	7,77E-04
Granjas (G)	1,64E-04
Ríos (R)	1,79E-02
EDAR (E)	1,92E-01

Tabla 1: Frecuencia de conjugación media según el origen de las cepas.

Es significativo señalar que una de las cepas que ha mostrado mayor capacidad conjugativa pertenece al filogrupo B2 (asociado a cepas más virulentas), lo que ratifica el riesgo de transmisión de cepas potencialmente peligrosas a través de estos entornos. La Tabla 2 muestra las características de las 4 cepas que han mostrado mejores frecuencias de conjugación.

Código	Origen	Frecuencia conjugación	Tipo BLEE	Filogrupo
1E	EDAR	2,45E+00	CTX-M15	B2
2E	EDAR	4,33E-02	CTX-M1	B1
1R	RIOS	1,27E-01	TEM-1, CTX-M1	B1
2R	RIOS	1,33E-02	CTX-M14	A

Tabla 2: Características de cuatro cepas aisladas de entornos acuáticos.

Finalmente, con el fin de confirmar que en los transconjugantes se había producido la transferencia horizontal de los genes implicados en las resistencias, se realizaron distintas PCRs para la detección de genes bla_{CTX-M} y bla_{TEM}. A modo de ejemplo, la Figura 1 muestra que 4 transconjugantes procedentes de cepas de granjas (1G, 2G y 3G) y ríos (1R) eran portadores del gen TEM-1 (amplificado a 516 pb).

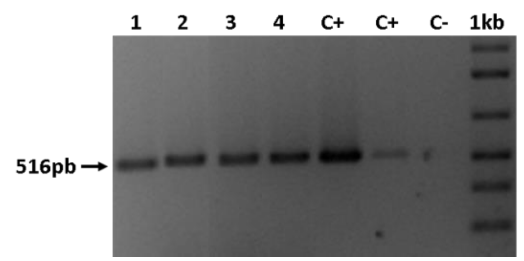


Figura 1: Detección por PCR del gen TEM-1 en los transconjugantes. 1: 1G; 2: 2G; 3: 3G; 4: 1R. 5-6: C+ TEM-1; 7: C-.

De igual modo, se muestra un ejemplo de 5 transconjugantes que habían adquirido el tipo de CTX-M presente en la cepa donadora (CTX-M1 o CTX-M9) (Figura 2).

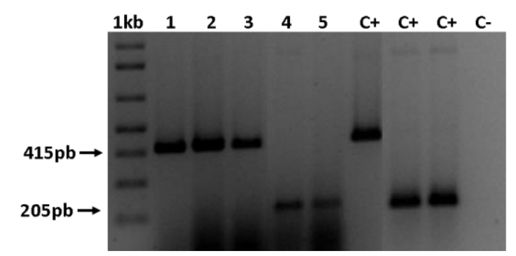


Figura 2: PCR mutiplex para la detección de CTX-M en los transconjugantes. 1: 1G; 2: 2G; 3: 2R; 4: 1E; 5: 2E. 6: C+ CTX-M1; 7-8: C+ CTX-M9; 9:C-.

En conclusión, la elevada capacidad conjugativa de estas cepas señala la importancia que adquiere el entorno acuático para el intercambio de genes y dispersión de resistencias, por lo que sería necesario controlar la presencia de bacterias superresistentes en entornos de riesgo como las estaciones de tratamiento de aguas residuales.

AGRADECIMIENTOS

A la "Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra" por la beca predoctoral concedida.

REFERENCIAS

[1] Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI. *Int J Environ Res Public Health*. **2017**, *14*(7):676.

[2] Vitas AI, Naik D, Pérez-Etayo L, González D. *Int J Food Microbiol*. **2018**, 269-80-6.

[3] Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. *J Antimicrob Chemother*. **2006**, *57*(1):145-5.

[4] Colom K, Pérez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna R. *FEMS Microbiol Lett*. **2006**, *223*(2):147-51.

SESIÓN 3B. INTERACCIONES ENTRE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

INTERACCIONES ENTRE MICROORGANISMOS PRESENTES EN ALIMENTOS Y PRINCIPALES APLICACIONES

Pérez-Nevado F.
Nutrición y Bromatología, Escuela de Ingenierías Agrarias, Universidad de Extremadura, Avda. Adolfo Suárez s/n, 06007, Badajoz. Instituto Universitario de Recursos Agroalimentarios (INURA), Universidad de Extremadura, Avda. de la Investigación s/n, 06006 Badajoz. E-mail: fpen@unex.es

¿Cuál es la importancia de los microorganismos en los alimentos?

Los alimentos son un medio perfecto para el crecimiento de diversos microorganismos, debido a su cantidad y variedad de nutrientes. Hay microorganismos perjudiciales, que hacen los alimentos incomestibles (alterantes), o peligrosos para la salud (patógenos). Sin embargo, muchos son de utilidad, favoreciendo su producción y/o conservación. Desde hace milenios, estos se emplean para producir alimentos fermentados. Debido a sus características metabólicas, las bacterias ácido lácticas fermentan productos lácteos, cárnicos y vegetales. En alimentos hay también hongos filamentosos, el principal, *Aspergillus oryzae*, se usa para fermentar la soja. Y entre las levaduras, las más relevantes son *Saccharomyces cerevisiae*, implicadas en el vino, pan o aceitunas.

¿Cómo interaccionan los microbios en los alimentos?

Los microorganismos fermentativos están muy adaptados a ecosistemas complejos, como leche o mosto de uva. Sus interacciones son fundamentales para el éxito y la seguridad de las fermentaciones; y los mecanismos moleculares y fisiológicos implicados son muy variados.

Las buenas relaciones entre vecinos

Hay gran cantidad de relaciones positivas entre microorganismos. Se puede decir que han evolucionado conjuntamente para adaptarse a las condiciones de un nicho, siendo necesarios para la fermentación y obtener un producto de éxito. Sin embargo, para una relación fructífera entre ellos se requieren unas condiciones, desarrolladas en la Hipótesis de la Reina Negra. A continuación, se detallan las principales interacciones positivas y sus mecanismos:

Mutualismo o relaciones sinérgicas

Ambos microorganismos, especies o cepas, salen beneficiados. El principal mecanismo se basa en interacciones tróficas**.** Es el caso de fermentaciones de yogur con *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*. *Streptococcus*, produce ácido fórmico, folato, CO_2 y otros compuestos que estimulan el crecimiento de *Lactobacillus*; a su vez, este suministra péptidos y aminoácidos a *Streptococcus*. En vinos, pueden producirse relaciones de neutralismo y estimulación entre levaduras y bacterias lácticas, como *Oenococcus oeni*.

Comensalismo: Un microbio se beneficia de otro, que no sale perjudicado ni beneficiado. Puede deberse a la degradación de proteínas y carbohidratos que liberan compuestos útiles para otros. Levaduras y mohos pueden asimilar ácido láctico, favoreciendo el desarrollo de bacterias y levaduras en aceitunas de mesa.

Los microbios se hacen la guerra

Además, hay microorganismos que dificultan el desarrollo de otros de su mismo ecosistema. Estas interacciones pueden ser:

Amensalismo o Antagonismo.

Un producto metabólico de una especie tiene un efecto negativo en otras. Un caso es la producción de etanol, un agente conservante muy efectivo producido por

levaduras. Otro es la producción de ácidos orgánicos (láctico y ácidos grasos de cadena corta). Bacterias ácido lácticas y bacterias acéticas producen ácidos orgánicos en fermentaciones lácteas, cárnicas y de vegetales. Diversas bacterias producen toxinas denominadas bacteriocinas (nisina y otras). Algunas cepas de *Lactococcus lactis* producen nisina y lacticina con efectos negativos sobre *Listeria monocytogenes*; cepas que podrían utilizarse como cultivos iniciadores en queso Cottage. También se han encontrado estirpes de levaduras productoras de toxinas *killer*. Hay una gran variedad de compuestos asociados al término *killer*; y son producidos por levaduras de productos vegetales (vinos, aceitunas, o higos) y de origen animal (jamón o quesos) [1]. Otro compuesto reseñable es el peróxido de hidrógeno, producido por bacterias lácticas frente a alterantes y patógenas (*Pseudomonas*, *Bacillus* y otras).

Otros mecanismos como el *quorum sensing*, juegan un papel significativo en muchos procesos biológicos para el control de la densidad de población. Se produce una comunicación célula-célula por secreción y detección de inductores moleculares. Sus funciones son muy variadas, incluyendo la formación de biopelículas, producción de toxinas, o transformación de levaduras a su forma filamentosa. En levaduras vínicas se ha descrito inhibición mediada por contacto entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (*Kluyveromyces* y *Torulaspora*) [2].

Estas relaciones son de gran utilidad para el biocontrol de patógenos o alterantes. Se ha observado que levaduras vínicas *Saccharomyces* provocan un rápido desplazamiento de otras no-*Saccharomyces* [3]. Esto no se debe a contacto celular y se ha relacionado con compuestos tóxicos diferentes de etanol o toxinas *killer*. Otros estudios han utilizado levaduras para controlar hongos filamentosos en postcosecha de frutas [4]. En esos estudios dos levaduras aisladas de higos, *Metschnikowia pulcherrima* y *Hansenula opuntiae*, eran efectivas para evitar la proliferación de hongos filamentosos.

Competición: Dos o más especies, cepas o subpoblaciones de microbios compiten por uno o más factores de crecimiento. Este, junto al amensalismo, es uno de los más determinantes en la sucesión de especies en alimentos. En fermentaciones vínicas, el consumo de tiamina por *Hanseniaspora uvarum* limita el crecimiento de *S. cerevisiae* [5].

Parasitismo: Un microorganismo se beneficia de otro. El ejemplo más clásico es el de los virus bacteriófagos de bacterias lácticas. Además, estudios sugieren que los parásitos pueden mejorar las relaciones de mutualismo [5].

¿Y qué ocurrirá en el futuro?

Desde el punto de vista de su utilidad para el ser humano, es muy interesante el uso de cultivos mixtos y de microorganismos como método de biocontrol en fermentaciones de alimentos. Quedan abiertas muchas preguntas para el futuro. Entre ellas, el comportamiento de las cepas en cultivos mixtos y en medios complejos, por lo que su estudio y aplicación es algo a considerar. Para entender todas las relaciones entre microorganismos en medios complejos y en cultivos mixtos, se plantea cada vez más el desarrollo y aplicación de tecnologías moleculares basadas en la secuencia de genomas. De este modo, se pretende aumentar nuestro conocimiento de estos ecosistemas y las relaciones que se producen entre los microorganismos.

REFERENCIAS

[1] Hernández A, Martín A, Córdoba MG, Benito M J, Aranda E, Pérez-Nevado F. *Int J Food Microbiol*, **2008**, *121*(2), 178-188.

[2] Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. *Yeast*, **2003**, *20*:331–41.

[3] Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T, Girio F. *Int J Food Microbiol*, **2006**, *108*(3), 336-345.

[4] Ruiz-Moyano S, Martín A, Villalobos MC, Calle A, Serradilla MJ, Córdoba MG, Hernandez A. *Food Microbiol*, **2016**, *57*, 45-53.

[5] Ivey M, Massel M, Phister TG. *Annu Rev Food Sci Technol.*, **2013**, *4*, 141-162.

EFECTO DE DISTINTOS BIOCIDAS EN LA TRANSMISIÓN HORIZONTAL DE LOS GENES DE RESISTENCIA A COLISTINA *mcr-1* Y *mcr-2*

Alvarez-Molina Adrián[1,2], Fernández-Gómez Paula[1,2], Mora-Gómez María[1,2], López Mercedes[1,2], Prieto Miguel[1,2], Alvarez-Ordóñez Avelino[1,2]
1 Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n, 24071, León, España
2 Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL), Universidad de León, C/ La Serna, 58, 24071, León, España.
aalvm@unileon.es

En 2015 se describió la existencia del primer determinante de resistencia a colistina localizado en un plásmido [1]. Desde entonces a esos genes de resistencia a colistina se les ha denominado *mcr* (mobilized colistin resistance) y se han hallado distintas variantes de ellos [2]. La transmisión horizontal de genes *mcr* en la cadena alimentaria desde cepas de *E. coli* a otros patógenos o microorganismos beneficiosos presentes en la cadena alimentaria es un hecho que merece ser estudiado.

Objetivo: Determinar cómo afecta la presencia de biocidas de uso común en la industria alimentaria a la transmisión horizontal de los genes de resistencia *mcr-1* y *mcr-2*.

Materiales y Métodos

Selección de cepas

Se seleccionaron como cepas donantes *E. coli* SHP45 y *E. coli* DTH2 (portadoras de *mcr1* y *mcr2* respectivamente) para determinar la transmisión de los genes de resistencia a colistina. Como cepas receptoras se consideraron: De la Colección Española de cultivos tipo (CECT) *Salmonella*: 443, 722, 4300, 4564 y 4594. De la CECT cepas de *E. coli*: 99, 515, 516 y 4267. De la colección Alemana (DSMZ) cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, y cepas de *Pseudomonas fluorescens*: 50090, 50091 y 50106.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante siembra en estría y en superficie en placas de agar Mueller-Hinton (Merck) suplementadas con antibióticos. La CMI a colistina de la cepa receptora debía ser inferior a la de las cepas donantes, y al mismo tiempo tener una CMI mayor que la de las cepas donantes frente a uno de los siguientes antibióticos cefotaxima, ciprofloxacina o estreptomicina.

Protocolo de transconjugación

Basándose en estudios previos sobre transferencia conjugativa de plásmidos [3,4] se optimizaron las condiciones necesarias para la transconjugación:

Las cepas se cultivaron por separado a 30ºC durante 18-24 h. en caldo BHI, suplementado con 4 µg/mL de colistina (sigma-Aldrich) en caso de las cepas donantes para evitar la pérdida del plásmido. Se prepararon inóculos en medio fresco de estas cepas y tras alcanzar la fase exponencial de crecimiento (Absorbancia a 560 nm de 0,250) se mezclaron 5 mL de caldo de la cepa donante y 5 mL de caldo de la cepa receptora y se centrifugaron a 6000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5804R) durante 8 minutos. Se descarto el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 0,5 mL de caldo BHI estéril, que fue depositado sobre filtros de uso general

(Whatman 90 mm) colocados en la superficie de placas de agar MH, que fueron incubadas a 30ºC durante 24 h. Posteriormente, se recuperaron los filtros en tubos de cultivo estériles con 10 mL de caldo BHI estéril y se sometieron a agitación intensa en vórtex durante 30 segundos. Se realizaron diluciones seriadas del caldo obtenido, que fueron sembradas en placas de agar suplementadas con cefotaxima (4μg/mL) para cuantificar las bacterias receptoras totales, y en placas con cefotaxima (4μg/mL) y colistina (4μg/mL) para cuantificar los eventos de transferencia conjugativa.

Confirmación mediante PCR

Las colonias transconjugantes obtenidas en placas de agar suplementadas con ambos antibióticos fueron caracterizadas molecularmente para comprobar que eran cepas receptoras portadoras del gen *mcr*-1 y *mcr-2* con los cebadores y condiciones detalladas en la tabla 1.

Gen	Secuencia del cebador 5'-3'
Pseudomonas 16S	F: GACGGGTGAGTAATGCCTA R: CACTGGTGTTCCTTCCTATA
Desnaturalización inicial de 5 minutos a 94ºC y 25 ciclos: 94 ºC 60', 54 ºC 90', 72ºC 60', elongación final 72ºC 10 min. Concentración de primers: 0,4 µM	
mcr1	F: CGGTCAGTCCGTTTGTTC R: CGGTCAGTCCGTTTGTTC
Desnaturalización inicial de 5 minutos a 94ºC y 25 ciclos: 94 ºC 30', 60 ºC 60', 72ºC 60', elongación final 72ºC 10 min. Concentración de primers: 0,01 µM	

Tabla 1: Reacciones y condiciones de PCR

Resultados

La cepa receptora elegida fue *P. Aeruginosa* PAO1, se seleccionó como cepa receptora al tratarse de una cepa no portadora de plásmidos, con su genoma secuenciado, y que cumplía las condiciones requeridas.

Se halló la CMI de las cepas seleccionadas se muestra en la tabla 2 para un pre-cultivo crecido a 37 ºC durante 24h y leído a las 48h.

Se ha optimizado un protocolo para el estudio de la transmisión horizontal de genes *mcr* entre cepas de *E. coli* portadoras de *mcr-1* y *mcr-2* y la cepa receptora PAO1.

	Colistina	**Cefotaxima**
Donantes (*mcr-1* y *mcr-2)*	8 µg/mL	2 µg/mL
Receptora	4 µg/mL	16 µg/mL
	Colistina + Cefotaxima	
mcr-1	4+4 µg/mL	
mcr-2	6+6 µg/mL	
Receptora	4+4 µg/mL	

Tabla2: CMI de las cepas y antibióticos

permite obtener transconjugantes de forma rutinaria, con una tasa media de transferencia horizontal del gen *mcr1* de $6{,}1x10^{-8}$.

En el XXI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos se presentarán resultados acerca del efecto que tienen los biocidas de uso alimentario ácido peracético, cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio a concentraciones sub-inhibitorias sobre las tasas de transferencia horizontal de los genes *mcr-1* y *mcr-2.*

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Fundación BBVA y al Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2016-78085-P) por la financiación recibida.

REFERENCIAS

[1] Y.-Y Liu. *et al. Lancet AIDCBC,* **2016,** ***16,*** 161–168.
[2] J. Zhang *et al. SRCEC3,* **2018,** *8,* 3705.
[3] A. B. Flórez, M. S. Ammor, & B. Mayo. *Int. J. Food Microbiol.* **2008,** *121,* 189–194.
[4] J. Lampkowska, *et al. Int. J. Food Microbiol.* **2008,** *127,* 172–175.

EL AGENTE BIOPRESERVANTE *PSEUDOMONAS GRAMINIS* CPA-7 REDUCE LA CAPACIDAD INVASIVA DE *SALMONELLA ENTERICA* Y *LISTERIA MONOCYTOGENES* DESPUÉS DE LA INTERACCIÓN EN PERA MÍNIMAMENTE PROCESADA

Collazo C.[1], Abadias M.[2], Colás-Medà P.[2], Iglesias M. B.[1], Granado-Serrano, A. B.[3], Serrano, J.[3], Viñas, I.[1]

1 Universidad de Lleida/Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos/ XaRTA-Postharvest / Centro Agrotecnio/ Rovira Roure 191, 25198 Lleida

2 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries/ XaRTA-Postharvest/ Edifici Fruitcentre, Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, Parc de Gardeny, 25003, Lleida

3 Universidad de Lleida/ Departamento de Fisiopatología Metabólica/ NUTREN-Nutrigenomics, PCiTAL-IRB, Lleida

ccollazo@tecal.udl.cat

Para la implementación de la biopreservación como alternativa al saneamiento con cloro para la conservación de frutas y verduras mínimamente procesadas es importante conocer su modo de acción. *Pseudomonas graminis* CPA-7 es una bacteria aislada de la superficie de manzana que ha mostrado capacidad antagonista contra los patógenos alimentarios *L. monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7 y *S. enterica* subsp. *Enterica* en frutas de cuarta gama [1, 2, 3, 4]. En el presente trabajo se estudió el efecto de CPA-7 sobre la capacidad infectiva de los patógenos humanos *S. enterica* y *L. monocytogenes* antes y después de la interacción en pera mínimamente procesada durante 6 días de conservación en condiciones aerobias a 10 °C, empleando la línea celular (Caco-2) como modelo del epitelio intestinal humano.

Los resultados mostraron que CPA-7 controló el crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en 5.5 y 3.1 log_{10}, respectivamente, después de 7 d de co-incubación en el fruto. CPA-7 atenuó la adherencia de *S. enterica* a las células Caco-2 en 0.8 log_{10}, independientemente de la interacción en el fruto, mientras que no afectó la adherencia de *L. monocytogenes* (Fig. 1).

La interacción patógeno-antagonista-alimento durante el período de pre-adaptación propiciaron la reducción de la capacidad de invasión de ambos patógenos, en 1.3 log_{10} para *L. monocytogenes* y por debajo del límite de detección (5 CFU/g) para *S. enterica*.

CPA-7 fue capaz de adherirse al epitelio intestinal lo que indicó la posibilidad de establecer competencia por sitios de adhesión en el epitelio intestinal. La capacidad de adhesión se incrementó en función de la concentración de inóculo. Sin embargo, la supervivencia de CPA-7 a la digestión gastrointestinal fue menor (en 2 log_{10}) después de la pre-incubación en la pera que inicialmente. Su adherencia no fue afectada por la digestión pero su invasión si se vio reducida a niveles indetectables, independientemente de la pre-adaptación en la matriz alimentaria.

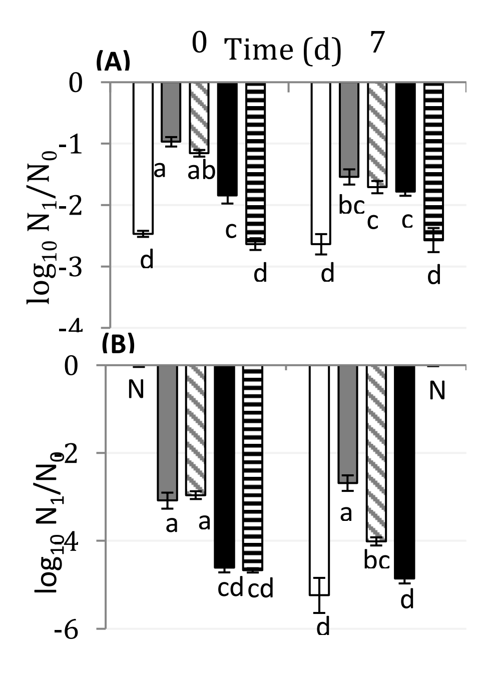


Figura 1. Reducción de la adhesión (A) y de la invasión (B) de *L. monocytogenes* CECT4032 y de *S. enterica* CECT4300 antes y después de la incubación en pera de cuarta gama: (☐) control CPA-7, (▩) control CECT 4032, (▧) CECT 4032 co-inoculada con CPA-7, (■)control CECT 4300 y (▤) CECT 4300 co-inoculada con CPA-7. Las columnas representan las medias de las reducciones logarítimicas: log_{10} (N_1/N_0), donde N_1 representa las células viables después del paso de adhesión o invasión y N_0 representa las bacterias adicionadas a las monocapas de células Caco-2 en cada caso. ND: no detectado. Las barras de error representan el error estándar de la media (n=12). Letras diferentes representan diferencias representativas según un análisis de varianzas (ANOVA) y un test de Tukey (P < 0.05).

El efecto de CPA-7 en las capacidades de colonización de los patógenos analizados pudiera estar dado tanto por la competencia establecida en la matriz que pudiera modular la expresión de genes de virulencia de los patógenos, como por la competencia por sitios de adhesión en el epitelio intestinal, la cual está influenciada por la multiplicidad de infección.

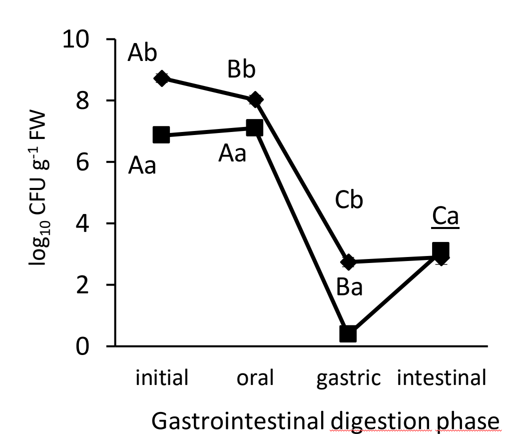


Figura 2. *P. graminis* CPA-7 dinámica poblacional durante la simulación digestiva, antes y después de de la incubación durante 7 d a 10 °C en pera de cuarta gama. Los símboles representan medias de los recuentos de viables en cada fase (n=6). Las letras representan diferencias significativas entre fases para cada tiempo de análisis (mayúsculas) o entre tiempos de análisis para cada fase (minúsculas) según un análisis de varianzas (ANOVA) y un test de Tukey (P < 0.05).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el programa CERCA / Generalitat de Catalunya, la Secretaria d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya (beca FI-DGR-2015-0004 and 2015-FI-B100156).

REFERENCIAS

[1] Alegre I, Viñas I, Usall J, Anguera M, Altisent R, Abadias M. *Food Microbiol*. **2013,** *33*: 139–48.

[2] Alegre I, Viñas I, Usall J, Teixido N, Figge MJ, Abadias M. *Food Microbiol*. **2013**, *34*: 390–9.

[3] Iglesias MB, Abadias M, Anguera M, Viñas I. *Food Microbiol.* **2018**, *70:* 103–12.

SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON ACTIVIDAD ANTI- *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN ALIMENTOS MADURADOS TRADICIONALES

Martín I., Rodríguez A., Alía A., Cordero J.M., Bernáldez V., Córdoba J.J.
Higiene y Seguridad Alimentaria. Instituto Universitario de Investigación de Carne y Productos Cárnicos (IProCar). Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. de la Universidad, s/n. 10003 Cáceres, España.
iremartint@unex.es

Resumen
En el presente trabajo se han seleccionado cepas de bacterias acido-lácticas (BAL) autóctonas de embutidos y quesos madurados con actividad anti-*L. monocytogenes* para su utilización en el control de esta bacteria patógena. La selección de aislados se realizó primero con el método de difusión en agar y posteriormente en ensayos de coinoculación con *L. monocytogenes* en medios cultivo elaborados con queso y salchichón. Más del 20% de aislados de BAL de quesos y embutidos curado-madurados presentaron algún tipo de actividad antagonista frente a *L. monocytogenes*, pero sólo determinadas cepas mostraron alguna inhibición del crecimiento de esta bacteria patógena en las condiciones de maduración de estos productos. Estas cepas podrían ser de gran interés para el control de *L. monocytogenes* en alimentos madurados tradicionales.

Introducción
Listeria monocytogenes es un microorganismo patógenos que representa un peligro en alimentos madurados debido a su gran ubicuidad y adaptación en las condiciones de elaboración. Esta bacteria se ha encontrado tanto en las industrias elaboradoras como en los propios alimentos madurados listos para el consumo (RTE- *Ready to Eat*) [1].
Por tanto, es necesario desarrollar estrategias eficientes capaces de controlar *L. monocytogenes* en alimentos madurados RTE. Entre estas estrategias están la utilización de cultivos protectores de microorganismos autóctonos no patógenos como las bacterias ácido-lácticas (BAL), aislados de embutidos curado-madurados y quesos madurados [2].
El objetivo de este estudio fue seleccionar cepas de BAL autóctonas de embutidos y quesos madurados con actividad anti-*L. monocytogenes* para poder ser utilizadas en estos productos como estrategia de control de esta bacteria patógena.

Material y métodos
Este estudio se desarrolló en 5 industrias de productos madurados tradicionales. En ellas se aislaron bacterias acido lácticas a partir de 21 embutidos y quesos madurados en distintos etapas de maduración. Los aislamientos de BAL se realizaron en agar MRS.
Los aislados de BAL obtenidos fueron seleccionados inicialmente en función de su actividad anti-*L. monocytogenes* mediante el método de difusión en agar. Para ello, se depositaron 5 discos de papel en placas de agar BHI, inoculados 4 de ellos con aislado de BAL, siendo el 5º disco usado como control. Tras 48 horas a 30 ºC se añadió a la placa agar BHI previamente inoculado con *L. monocytogenes* S7-2 (Figura 1). Posteriormente las placas se sometieron a incubación durante 72 horas a 30ºC y se determinaron los diámetros de los halos de inhibición

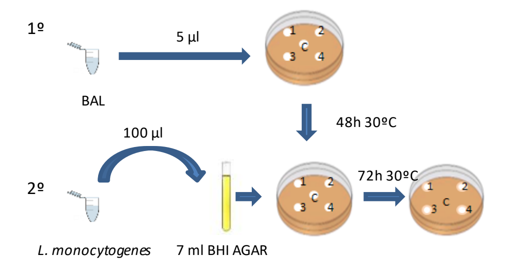


Figura 1: Esquema de la metodología usada para este ensayo.

Los aislados que mostraron halo de inhibición se sometieron a segunda evaluación de actividad anti-*L. monocytogenes* en medios de cultivo elaborados con queso o salchichón liofilizados [3], según la procedencia del aislado. En ambos medios se inocularon conjuntamente los aislados de BAL y *L. monocytogenes* S7-2 a niveles de *c.a.* 3 log ufc por placa cada uno y se incubaron a 7ºC durante 7 días simulando condiciones de maduración de productos madurados tradicionales. Transcurrido este tiempo se evaluó el crecimiento de *L. monocytogenes* en agar ALOA y se comparó con los controles sin BAL.

Resultados y discusión

De los 206 aislados de BAL obtenidos 49 mostraron actividad anti-*L. monocytogenes,* lo que representa un 23,8% del total de las bacterias estudiadas (Figura 2), siendo este porcentaje de BAL con actividad muy similar al obtenido por otros autores [4]. Los halos de inhibición de los aislados activos variaron entre 1-13,5 mm dependiendo de la cepa. Además, cabe destacar que la mayoría de las cepas con actividad antagonista fueron aisladas de chorizo (Figura 2).

En la segunda selección de aislados de BAL realizadas en condiciones de maduración, sólo determinadas cepas mostraron capacidad de inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, lo que muestra la importancia de esta fase en la selección de BAL para su utilización como cultivos protectores en productos madurados.

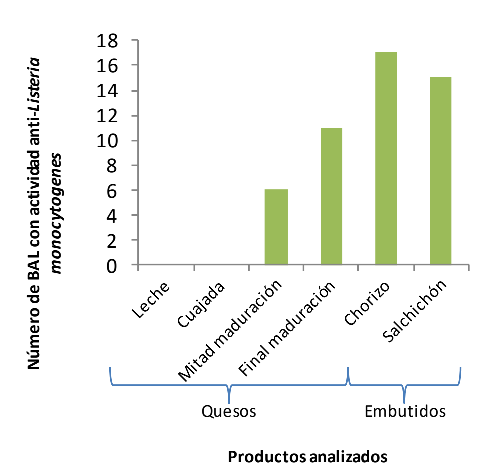


Figura 2: Número de bacterias ácido lácticas (BAL) con actividad anti-*Listeria monocytogenes.*

Conclusiones

Aunque un porcentaje elevado de aislados de BAL de quesos y embutidos madurados presentan algún tipo de actividad antagonista frente a *L. monocytogenes*, sólo determinadas cepas son capaces de provocar inhibición del crecimiento de esta bacteria patógena en condiciones de maduración de estos productos. Estas cepas podrían ser de gran interés para el control de *L. monocytogenes* en alimentos madurados tradicionales.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por proyectos IB16149 (Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructuras-, Fondo Europeo de Desarrollo Regional- "Una manera de hacer Europa") e INIA RTA-2013-00070-C03-03. I. Martín es beneficiario de una beca FPU (16/05303).



Fondo Europeo de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"



REFERENCIAS

[1] C. Fontana, P.S. Cocconcelli, G. Vignolo, L. Saavedra. *Food Control*, **2015**, *47*, 53-57.

[2] A.A. Texeira de Carvalho, R. Aparecida de Paula, H.C. Mantovani, C. Alencar de Moraes. *Food Microbiol.* **2006**, *23*, 213-219.

[3] A. Rodríguez, A. Medina, J.J. Córdoba, N. Magan *Int J Food Microbiol.* **178**, 113-119.

[4] S. Melia, E. Purwati, Y. Jaswandi, S.N. Aritonang, M. Silaen. *Pakistan J. Nutrit.* **2017**, *16*, 645-650.

INTERACCIÓN METABIÓTICA ENTRE *SALMONELLA ENTERICA* Y LOS PRINCIPALES MOHOS CAUSANTES DE PODREDUMBRE EN FRESAS

Valero A.[1], Viñas I.[2], Ortiz-Sola, J.[2], Colás-Medà P.[3], Anguera M.[3], Martínez R.[2], Abadias M.[3]

1 Universidad de Córdoba/Facultad de Veterinaria/Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos/Campus Rabanales s/n. Edif. Darwin axexo C1. Crta. Madrid-Cádiz Km 396A. 14014, Córdoba

2 Universitat de Lleida/Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos/ XaRTA-Postharvest/ Centro Agrotecnio/ Rovira Roure 191, 25198 Lleida

3 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries/ XaRTA-Postharvest/ Edifici Fruitcentre, Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, Parc de Gardeny, 25003, Lleida.

avalero@uco.es

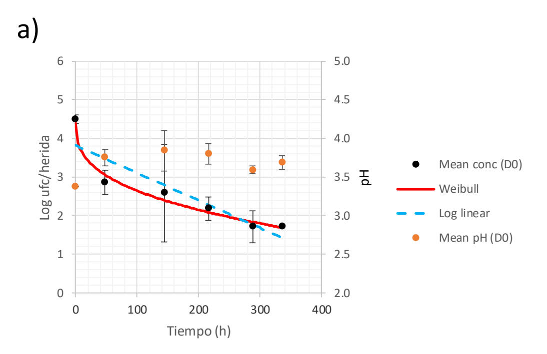
El incremento de la demanda de frutos rojos en España ha traído consigo un aumento considerable de la superficie de producción. Entre ellos, las fresas son un fruto altamente perecedero y con una vida útil muy corta, debido principalmente a la aparición de podredumbres causadas por *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. Asimismo, patógenos como *Salmonella* y norovirus pueden estar presentes en fresas y frambuesas frescas y congeladas y por tanto, constituir un riesgo emergente para la salud pública [1].

En este estudio se evaluó la interacción metabiótica de los principales mohos alterantes en fresa (*B. cinerea* y *R. stolonifer*) sobre el comportamiento de *S. enterica*. Para ello, se inocularon 10 µl de una suspensión fúngica (~10^5 y 10^4 conidias/ml, respectivamente), 1 (D1), 2 (D2) días antes, así como en el mismo momento (D0) que un 'cocktail' de distintas cepas de *S. enterica* (BAA-707, 709, 710, 711 y CECT-4300, 10^7 ufc/ml) sobre heridas realizadas en la superficie de las fresas. Se monitorizó la evolución bacteriana y el pH de la herida durante un almacenamiento de hasta 5 y 14 días a 20 y 4 °C, respectivamente. Posteriormente, se ajustaron una serie de modelos predictivos (Weibull y log lineal) a los datos de supervivencia de *S. enterica* para cada temperatura estudiada con objeto de predecir la tasa de inactivación (log ufc/h). Por último, se llevó a cabo un análisis univariante (ANOVA) para evaluar el efecto de la temperatura, momento de inoculación del moho (D0, D1 y D2) y tipo de moho sobre la inhibición de *S. enterica*.

Los resultados demostraron que la presencia de los mohos afectó negativamente a la supervivencia de *S. enterica*, existiendo una mayor inhibición de *B. cinerea* con respecto a *R. stolonifer* ($p<0.05$). Asimismo, se observaron diferencias significativas con respecto al momento de inoculación del moho, siendo mayor la inactivación para el momento D2 ($p<0.05$). Esto pudo ser debido a la competencia de los mohos, así como a una acidificación de la fruta en el lugar donde se desarrollaron. Por tanto, la fresa constituye un medio hostil para el crecimiento de *Salmonella*, corroborando lo obtenido por otros autores [2] donde se observó una reducción de 2-3 log ufc tras 5 días de almacenamiento en refrigeración (4 – 15 °C).

Por otro lado, se demostró que hubo diferencias significativas en la inhibición de los patógenos a las temperaturas ensayadas. El almacenamiento a 20 °C presentó un efecto inhibitorio significativamente menor que el tratamiento a 4 °C sobre ambos patógenos ($p<0.05$).

a)



b)

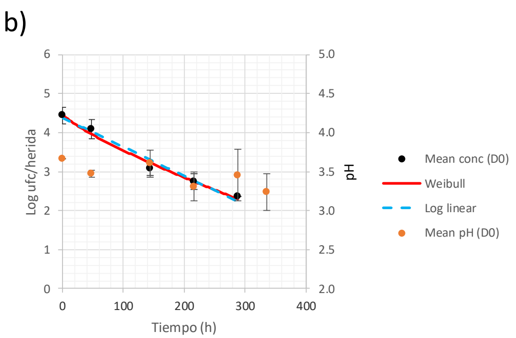


Figura 1: Efecto de la inhibición de *B. cinerea* (a) y *R. stolonifer* (b) sobre *S. enterica* inoculados sobre heridas en superficie de fresa a 4 °C.

Como se puede observar en la Fig. 1, la inhibición causada por *B. cinerea* a 4 °C redujo la población de *S. enterica* aprox. 1.5 log ufc/herida tras 50h de almacenamiento. En el caso de la inhibición causada por *R. stolonifer*, la inhibición fue < 1 log ufc/herida.

Las variaciones de pH a lo largo del almacenamiento no fueron significativas a ambas temperaturas, manteniéndose en unos valores en torno a 3.4 – 3.9.

En relación con los modelos predictivos utilizados, tanto el modelo Weibull como el log linear presentaron un buen ajuste a los datos observados ($R^2 > 0.80$; MSE <0.52). En la mayoría de las condiciones ensayadas se observó una tendencia lineal, aunque en algunos casos, la inactivación fue de tipo no lineal, existiendo una fase inicial "hombro" o de resistencia de *S. enterica* y una fase final o región "cola" demostrando la existencia de una población residual de *S. enterica* al final del almacenamiento. Los valores estimados de tasa de inactivación (k_{max}) oscilaron entre 0.009 y 0.143 log ufc/herida/h.

Por tanto, se concluye que la presencia de mohos causantes de podredumbres reduce la población de *S. enterica* en caso de que aparezca en la cadena de producción de fresa fresca o congelada. No obstante, la implementación de buenas prácticas de higiene durante la recolección y posterior transformación en la industria se antojan indispensables para garantizar la seguridad microbiológica de estos alimentos, catalogados como listos para el consumo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a MINECO por su apoyo económico (AGL2016-78086-R, FRESAFE) y al Programa CERCA (Generalitat de Catalunya).

REFERENCIAS

[1] EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). EFSA Journal **2014**;12(6):3706, 95 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3706.

[2] Delbeke, S., Ceuppens, S., Jacxsens, L., Uyttendaele, M. *J. Food Prot.* **2015**, *78*, 652-660.

EFECTO DE *Debaryomyces hansenii* EN EL CRECIMIENTO Y EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN JAMÓN CURADO LONCHEADO

Alía A., Martín I., Padilla P., Sánchez-Montero L., Córdoba J.J.

Higiene y Seguridad Alimentaria. Instituto Universitario de Investigación de Carne y Productos Cárnicos (IProCar). Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Avda. de las Ciencias, s/n, 10003, Cáceres, España.

albertoam@unex.es

Resumen. El jamón curado loncheado es susceptible de contaminación por *Listeria monocytogenes* durante su deshuesado y loncheado. Un posible método de control de este patógeno es la utilización de cultivos protectores de microorganismos autóctonos en jamón como *Debaryomyces hansenii*. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *D. hansenii* en el crecimiento y la expresión de dos genes de virulencia de *L. monocytogenes* (*hly* e *iap*). Para ello, se inoculó una cepa seleccionada de *D. hansenii* junto con *L. monocytogenes* en lonchas de jamón curado a actividades de agua (a_w) de 0,95 y 0,93. En general, *D. hansenii* no inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* en las lonchas de jamón en ambos valores de a_w ensayados y además estimuló la expresión de los genes de virulencia de esta bacteria patógena en las lonchas con a_w 0,95. Aunque son necesarios más estudios, la utilización de *D. hansenii* no parece una estrategia adecuada para el control de *L. monocytogenes* en jamón curado loncheado.

Introducción

Listeria monocytogenes provoca listeriosis, una de las enfermedades alimentarias más severas en los países industrializados. Los productos listos para el consumo o RTE (Ready-To-Eat) como el jamón curado loncheado, han sido identificados como vehículos potenciales de este patógeno debido principalmente a la posible contaminación durante las fases de deshuesado y loncheado del producto. La utilización de métodos de biocontrol basados en el uso de levaduras como cultivos protectores podría ser una estrategia adecuada encaminada a reducir la presencia de *L. monocytogenes. Debaryomyces hansenii* es una de las especies de levaduras más comúnmente aislada de jamón curado [1].

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de *D. hansenii* en el crecimiento y la expresión de genes de virulencia de *L. monocytogenes*.

Material y métodos

En este trabajo se ha utilizado 1 cepa del serotipo 1/2c de *L. monocytogenes* aislada de jamón curado procedente de la colección de cultivos microbianos del INIA; y 1 cepa de *D. hansenii* aislada de jamón curado y seleccionada previamente por su actividad anti-*L. monocytogenes* en medios de cultivo.

El efecto antimicrobiano de *D. hansenii* se evaluó en lonchas de jamón curado con una superficie de 16 cm^2, previamente esterilizadas y con valores de activad de agua (a_w) de 0,95 y 0,93. A continuación, las lonchas fueron inoculadas en dos lotes, un lote control (sin levadura) y un lote mixto (con *L. monocytogenes y* levadura) con una concentración de *c.a.* 2 log ufc/cm^2 de ambos microorganismos e incubadas a 7 °C durante 10 días. Al finalizar el periodo de incubación, se llevaron a cabo los recuentos de *L. monocytogenes* y la levadura en el medio cromogénico ChromAgar™ Listeria y en agar extracto de levadura sacarosa (YES),

respectivamente. Además, se analizó la expresión génica relativa de *L. monocytogenes* tras la exposición a *D. hansenii* mediante el análisis de dos genes de virulencia, *hly* e *iap,* utilizando para ello el método descrito por Alía et al. [2].

Resultados

L. monocytogenes creció en las lonchas de jamón curado alcanzando recuentos de aproximadamente 5 log ufc/cm^2 y 2 log cfu/cm^2 a los valores de a_w de 0,95 y 0,93, respectivamente (Fig. 1A). En cuanto a la actividad anti-*L. monocytogenes* de *D. hansenii*, no se observó reducción significativa (p≤0,05) en ninguna de los niveles de a_w ensayados.

Cuando se evaluó el efecto de la levadura sobre la expresión de los genes de virulencia *hly e iap* de *L. monocytogenes*, se observó un incremento de la expresión de ambos genes en la a_w de 0,95 (p≤0,05) (Fig. 1B).

Discusión

D. hansenii ha demostrado ser un buen candidato como cultivo protector frente a otros microorganismos [3]; sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo no mostraron un efecto positivo en cuanto a la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* en lonchas de jamón curado. Además, *D. hansenii* podría favorecer la expresión de genes de virulencia de *L. monocytogenes*. Por tanto, aunque son necesario nuevos estudios en los que se incluyan mayor número de genes de virulencia, la utilización de *D. hansenii* como cultivo protector en jamón curado loncheado podría incrementar la virulencia de *L. monocytogenes*.

Conclusiones

La utilización de cepas seleccionadas de *D. hansenii* como cultivo protector en lonchas de jamón curado no inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes*, pudiendo incluso favorecer la expresión de sus genes de virulencia, lo que limita su uso en este tipo de productos como estrategia de biocontrol.

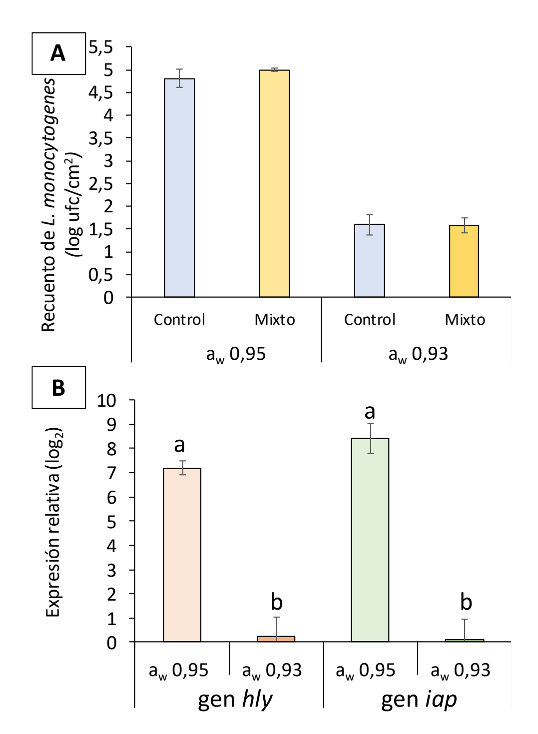


Figura 1: **A)** Recuentos de *L. monocytogenes* (log ufc/cm^2) tras 10 días de incubación a 7°C, en el lote control (sin levadura) y en el lote mixto (con levadura) en a_w de 0,95 y 0,93. **B)** Expresión relativa ($\log_2$) de los genes *hly* e *iap de L. monocytogenes* en presencia de *D. hansenii* en lonchas de jamón curado en ambas a_w. Diferentes letras implican diferencias significativas en la expresión de un mismo gen a distintas a_w.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por los proyectos INIA RTA-2013-00070-C03-03 y IB16149 (Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructuras, Fondo Europeo de Desarrollo Regional- "Una manera de hacer Europa"). Alberto Alía es beneficiario de una beca predoctoral de la Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructura-, Fondo Social Europeo- "Una manera de hacer Europa" (PD16023).



Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fondo Social Europeo
Una manera de hacer Europa



REFERENCIAS

[1] Andrade, M.J., et al. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 578-586.

[2] Alía, A., Rodríguez, A., Andrade, M.J., Gómez, F.M., Córdoba, J.J. Meat Science. Enviado.

[3] Núñez, F., et al. *Food Microbiol.*, **2015**, *46*, 114-120.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE COMPETICIÓN DE *DEBARYOMYCES HANSENII* FRENTE A *PENICILLIUM NORDICUM* EN CONDICIONES AMBIENTALES HABITUALES DEL PROCESADO DE DERIVADOS CÁRNICOS-CURADO MADURADOS

Álvarez M.M., Rodríguez A., Peromingo B., Bermúdez E., Núñez F.
Universidad de Extremadura. Facultad de Veterinaria. Higiene y Seguridad Alimentaria.
IPROCAR. Avenida de las Ciencias s/n, 10004.
marielaalvarez9@hotmail.com

Resumen. *Penicillium nordicum* puede producir ocratoxina A (OTA) en derivados cárnicos-curado madurados. Para su control se ha propuesto a *Debaryomyces hansenii*, levadura con actividad antifúngica, mayoritaria en estos productos, aunque sus mecanismos de acción no se conocen en profundidad. El objetivo fue determinar si la actividad antifúngica de *D. hansenii* frente a *P. nordicum* en condiciones de temperatura (25, 20 y 15 ºC) y actividad de agua (a_w 0,97 y 0,94) habituales en el procesado de estos productos estaba basada en la competición por nutrientes y sustrato. Para ello, se determinaron la utilización de fuentes de carbono (FC), el índice de superposición de nicho (NOI) y la competición entre ambas especies. *P. nordicum* utilizó un mayor número de FC y el NOI mostró que se encontraba favorecido nutricionalmente. Sin embargo, *D. hansenii* redujo el crecimiento del moho y la producción de OTA. En conclusión, *D. hansenii* puede ser propuesta como agente de biocontrol para reducir OTA en productos cárnicos, aunque su actividad antagónica no se debe a la competición por nutrientes y sustrato.

Introducción. *P. nordicum* coloniza con frecuencia la superficie de derivados cárnicos curado-madurados durante su maduración. Este moho es productor de ocratoxina A (OTA), una micotoxina posiblemente carcinógena. Para reducir la presencia de OTA se ha propuesto el empleo de agentes de biocontrol presentes en la población habitual de estos productos, como *D. hanseni*, levadura mayoritaria en este tipo de alimentos. La actividad antifúngica de las levaduras puede deberse a la competición por nutrientes y sustrato, la producción de compuestos o enzimas líticas o la degración de la micotoxina por parte de la levadura [1]. El objetivo del estudio fue conocer si el mecanismo de acción de *D. hansenii* frente a *P. nordicum* estaba basado en la competición por nutrientes y sustrato.

Material y métodos. Se empleó la cepa de *P. nordicum* Pnib4 y la levadura *D. hansenii* 253H, ambas aisladas de jamón curado. Se analizó la utilización de 20 FC (aminoácidos y azúcares) por estas cepas en placas multipocillo. La utilización de las FC se determinó midiendo la transformación de la resazurina mediante un espectrofotómetro de fluorescencia. Con ello se realizó el cálculo del NOI:

$NOI_{A+B/A}$= FC usadas por A y B /FC usadas por A.

Utilizando las FC asimiladas por ambos microorganismos se preparó un medio de cultivo en el que se inocularon las dos cepas a una distancia de 2 cm. Se analizó el crecimiento de *P. nordicum* midiendo diariamente el diámetro horizontal de las colonias durante 15 días. Se analizó la producción de OTA mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD). Todos los experimentos se realizaron a tres Tª (25, 20 y 15 ºC) y dos valores de a_w (0,97 y 0,94).

Resultados y discusión: *P. nordicum* empleó más FC que *D. hansenii* (Figura 1).

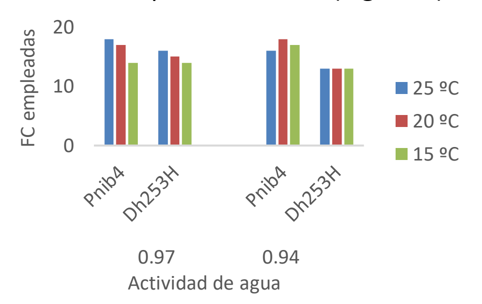


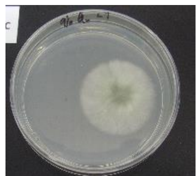
Figura 1. Fuentes de carbono empleadas.

Los valores de NOI (Tabla 1) muestran que solo a 15ºC existe coexistencia de las dos cepas (NOI>0,9). En el resto de las temperaturas *P. nordicum* se encuentra favorecido nutricionalmente (NOI<0,9) frente a *D. hansenii* (NOI>0,9).

Tª (ºC)	*D. hansenii*	*P. nordicum*
25	0,94	0,83
20	0,93	0,82
15	0,93	0,93

Tabla 1. Valores de NOI para *P. nordicum* y *D. hansenii*.

D. hansenii provocó una disminución significativa ($p \leq 0.05$) del crecimiento de *P. nordicum* en todas las condiciones estudiadas (Figura 2).


P. nordicum

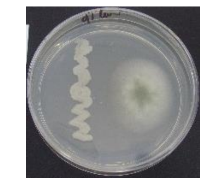

D. hansenii-P. nordicum

Figura 2: Efecto de la presencia de *D. hansenii* sobre el crecimiento de *P. nordicum* tras 15 días a 25 ºC y a_w de 0,97.

Esta inhibición puede estar relacionada probablemente con la producción de algún compuesto con actividad antifúngica [2] ya que los valores de NOI mostraban una dominancia del moho.

D. hansenii también provocó una reducción en la concentración de OTA (Tabla 2). La capacidad de esta levadura para disminuir la producción de OTA se ha atribuido a la represión en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de esta micotoxina [3].

0,97 a_w	15 ºC	20 ºC	25 ºC
Pn	7,50	<0,1	<0,1
Pn+Dh	<0,1	<0,1	<0,1
0,94 a_w	15 ºC	20 ºC	25 ºC
Pn	1,50	3,10	4,06
Pn+Dh	<0,1	<0,1	<0,1

Tabla 2. Concentración de OTA (ng/g agar) producida por *P. nordicum* (Pn) en ausencia y presencia de *D. hansenii* (Dh) en distintas condiciones de temperatura y actividad de agua.

Conclusión. La actividad antifúngica de *D. hansenii* no puede atribuirse a la competición por nutrientes. Sin embargo, debido a su capacidad para reducir el crecimiento de *P. nordicum* y la producción de OTA la cepa de *D. hansenii* estudiada puede ser propuesta como agente para el biocontrol del peligro de OTA en productos cárnicos.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado con los proyectos AGL2016-80209-P (Ministerio de Economía y Competitividad) e IB16045 (Junta de Extremadura-Consejería de Economía e Infraestructuras-, Fondo Europeo de Desarrollo Regional- "Una manera de hacer Europa"). M.M Álvarez es beneficiaria de la ayuda BES-2017-081340 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades).

REFERENCIAS

[1] J. Delgado, B. Peromingo, F. Núñez, M. A. Asensio. *Curr. Opin. Food Sci*. **2016,** *11*, 40–45.

[2] F. Núñez, M. S. Lara, B. Peromingo, J. Delgado, L. Sánchez-Montero, M. J. Andrade. *Food Microbiol.* **2015,** *46*, 114–120.

[3] B. Peromingo, F. Núñez, A. Rodríguez, A. Alía, M. J. Andrade. *Int. J. Food Microbiol*. **2018**, *268*, 73–80.

LA FORMACIÓN DE BIOFILM COMO ATRIBUTO DE VIRULENCIA EN *CAMPYLOBACTER*

Silván J. M., Pérez Boto D., Martínez-Rodríguez A. J.
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM) / Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos / Grupo de Microbiología y Biocatálisis de Alimentos. C/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid.
adolfo.martinez@csic.es

Introducción

Entre los microrganismos patógenos asociados a los alimentos, *Campylobacter* es desde hace varios años y a nivel mundial, la causa más frecuente de enfermedades diarreicas de origen bacteriano [1]. Según la máxima Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el año 2015 se confirmaron 29.213 casos de campilobacteriosis en la Unión Europea. [2]. *Campylobacter* es el principal patógeno bacteriano asociado a los alimentos, a pesar de su extrema sensibilidad a diversos tipos de estrés, lo que constituye toda una paradoja microbiològica. A esta capacidad de sobrevivir en la cadena alimentaria contribuyen diversos atributos de virulencia que emplea este patógeno como herramientas para provocar la enfermedad en humanos, denominada campilobacteriosis. Entre estos atributos de virulencia, se ha descrito que la capacidad de formar biofilm podría ser una característica muy relevante del genero *Campylobacter* para sobreponerse a los diferentes tipos de estrés presentes en la cadena alimentaria. En el presente trabajo, se ha determinado la capacidad de diferentes cepas, aisladas tanto de la cadena alimentaria de la carne de pollo, como de pacientes con campilobacteriosis, de formar biofilm. Se ha evaluado el impacto de la capacidad de formar biofilm en la virulencia de este patógeno alimentario y en el incremento de su resistencia diferentes tratamientos.

Materiales y Métodos

Se utilizaron un total de 50 cepas de *Campylobacter*: 29 cepas aisladas de la cadena alimentaria (CA) de la carne de pollo (23 cepas de *C. jejuni* y 6 cepas de *C. coli*) y 21 cepas aisladas de casos clínicos (H) de campilobacteriosis (16 cepas de *C. jejuni* y 5 cepas de *C. coli*). Las diferentes cepas se recuperaron por siembra en placas de Mueller Hinton Sangre y se incubaron en condiciones de microaerofilia (85% N2, 10% CO2 y 5% O2) utilizando un incubador de atmósfera variable (VAIN MACS-VA500, Don Whitley Scientific) a una temperatura de 42ºC durante 48 horas. Para la determinación de la capacidad de *Campylobacter* de formar biofilm en superficies abióticas se utilizó un método basado en el protocolo descrito previamente por Reeser y col. [3] con modificaciones realizadas para el presente trabajo. El estudio del impacto de la formación de biofilm en la actividad antimicrobiana de los compuestos estudiados se llevó a cabo siguiendo la metodologia descrita en Silván y col en 2014 [4].

Resultados y Discusión

En la Figura 1 se presenta la comparación de los valores medios de formación de biofilm entre las cepas de *Campylobacter* aisladas de la cadena alimentaria de la carne de pollo (CA) y las cepas clínicas (H). Como se puede observar, las cepas aisladas de la cadena alimentaria formaron mayor cantidad de biofilm que las cepas de origen clínico, lo que sugiere que la capacidad de

formar biofilm podría ser una herramienta utilizada por las cepas alimentarias para incrementar su virulencia y perdurar a lo largo de toda la cadena alimentaria de la carne de pollo.

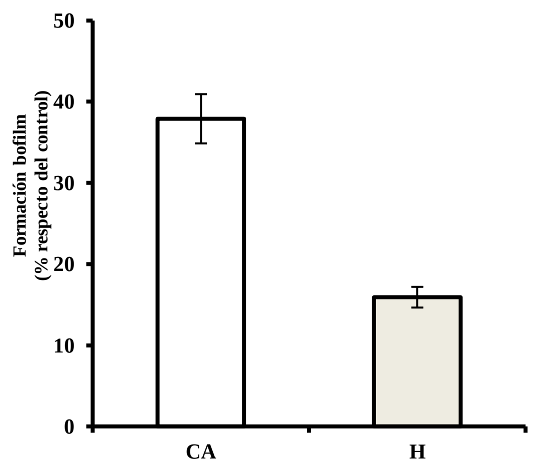


Figura 1: Formación de biofilm en cepas de la cadena alimentaria de la carne de pollo (CA) y de cepas provenientes de casos de campilobacteriosis (H).

Cuando a las cepas estudiadas se le añadió exudados de pollo, se observó un incremento de la formación de biofilm en todas las cepas. Sin embargo, este procedimiento no favoreció la formación de biofilm en aquellas cepas no formadoras. Las cepas de *C. coli* fueron más productoras de biofilm que las cepas de *C. jejuni*. La mayoría de los casos documentados de campilobacteriosis a nivel mundial se deben a la especie *C. jejuni*, que representa aproximadamente el 90% de los aislamientos confirmados, asociándose el 10% restante de los casos a la especie C. coli [1]. Sin embargo, en los últimos años se ha reportado en todo el mundo la emergencia de cepas de *C. coli* resistentes a diversos antibióticos, incluyendo macrólidos como la eritromicina, el cual se considera la principal opción terapéutica en el caso de la campilobacteriosis. El hecho de que esta especie presente además atributos de virulencia específicos como es una mayor capacidad de formar biofilm, la convierte en una candidata potencial a ser considerada en el futuro como una protagonista de mayor relevancia en la infección humana por *Campylobacter*. Al comparar la capacidad de formar biofilm de ocho cepas de *C. jejuni* aisladas de dos lugares diferentes de la cadena alimentaria de la carne de pollo, jaulas y máquinas desplumadoras, antes y después de su higienización por parte de los operarios, se observó que las cuatro cepas aisladas de superficies limpias fueron capaces de producir más biofilm que las cuatro cepas aisladas de superficies sucias, lo que evidencia que la producción de biofilm podría contribuir a la resistencia de este patógeno a los protocolos de higienización, y por tanto ser una estrategia relevante en la prevalencia de *Campylobacter* en la cadena alimentaria de la carne de pollo. Finalmente, la producción de biofilm aumentó la resistencia de las cepas a desinfectantes como el hipoclorito sódico y a antimicrobianos naturales, como es el caso de un extracto de semilla de uva.

Conclusiones

La formación de biofilm puede ser una estrategia de supervivencia de *Campylobacter* en la cadena alimentaria y aumentar su resistencia a desinfectantes y otros compuestos antimicrobianos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos AGL 2013-47694-R y AGL2017-89566-R del CSIC.

REFERENCIAS

[1] Ganan, M., Silván, J.M., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J. *Food Control*, **2012**, *24*, 6-14.

[2] EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). *EFSA J.*, **2017**, *15*, 4694, 212.

[3] Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., Joens, L. A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, *73*, 1908-1913.

[4] Silvan, J.M., Mingo, E., Hidalgo, M., de Pascual-Teresa, S., Carrascosa, A.V., and Martinez-Rodriguez, A.J. *Food Control*, **2013**, *29*, 25-31.



SESIÓN 4A. PROBIÓTICOS Y ALIMENTOS FUNCIONALES

UN PROBIOTICO DE NUEVA GENERACIÓN DESDE EL LABORATORIO AL CONSUMIDOR: EL EJEMPLO DE *Faecalibacterium praustnizii*

Langella P., Martín R.
Commensals and Probiotics-Host Interactions Laboratory, Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France.
rebeca.martin-rosique@inra.fr

Hoy en día, los humanos pueden considerarse como "meta-organismos" compuestos por 10 veces más microorganismos que de células humanas. Estos microorganismos, llamados microbiota, son diferentes dependiendo del órgano considerado. Como consecuencia del mutualismo establecido entre el huésped y su microbiota, la microbiota intestinal es clave para el mantenimiento de la homeostasis de un individuo sano. De hecho, la microbiota intestinal suministra nutrientes esenciales, metaboliza compuestos no digeribles y protege al huésped contra la colonización de patógenos. También contribuye al desarrollo de la arquitectura intestinal, así como a varias funciones inmuno-moduladoras. En determinadas condiciones, puede producirse un desequilibrio microbiano conocido como disbiosis, que se caracteriza por el crecimiento de diferentes bacterias no predominantes y/o la reducción de las comensales que puede conducir a una situación de enfermedad. Como resultado, este desequilibrio también acarrea la reducción de algunos efectos beneficiosos de estas bacterias comensales y, por lo tanto, desencadenar enfermedades no solo debido al crecimiento excesivo de patógenos. Por estos motivos, la idea de utilizar algunos miembros de la propia microbiota como probióticos de nueva generación (PNG) ha comenzado a destacarse. Los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped". La mayoría de los probióticos tradicionales pertenecen tanto al grupo de Bacterias de Ácido Láctico (LAB) como a Bifidobacteria. Estos nuevos probióticos se consideran, por lo tanto, como PNG que, en comparación con los tradicionales, no se seleccionaron sobre la base del análisis de la microbiota humana. Para considerar una cepa como probiótica debe: i) estar bien caracterizada, ii) cumplir los requisitos de seguridad, y iii) conferir efectos beneficiosos al huésped. Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las cepas probióticas tradicionales, estos PNG no están reconocidos oficialmente como organismos seguros. Además, al no tener un largo historial de seguridad de consumo (en concreto, ningún uso seguro documentado en Europa antes de 1997), estos PNG deben ser usados como nuevos alimentos o medicamentos siendo los requisitos para su comercialización en Europa mucho más estrictos que para cepas probióticas convencionales (1).

Faecalibacterium prausnitzii es un miembro del grupo *Clostridium* y representa alrededor del 5% de la microbiota fecal total en adultos sanos (2). En los últimos años, esta bacteria ha sido propuesta como un biosensor y un actor principal de la salud intestinal humana debido a su importancia en el ecosistema intestinal. De hecho, se ha demostrado la reducción de los niveles de *F. prausnitzii* en pacientes que padecen varios síndromes y

enfermedades tales como enfermedades inflamatorias del intestino (EII), síndrome del intestino irritable (SII), cáncer colorrectal (CCR), obesidad y enfermedad celíaca, así como en ancianos frágiles (2).
Debido a su importante papel en la homeostasis del tracto gastrointestinal, *F. prausnitzii* se considera hoy en día como un potencial PNG. Con el objetivo de probar sus posibles efectos beneficiosos como PNG, se ha utilizado esta bacteria en varios modelos murinos inflamatorios de EII y SSI con resultados positivos (3). También se ha observado que *F. prausnitzii* es capaz de reducir la sensibilidad al dolor en los modelos murinos de estrés de restricción parcial y separación neonatal (3). Así mismo, se ha determinado que *F. prausnitzii* ejerce sus efectos benéficos por medio de diferentes efectores: (A) péptidos MAM secretados, (B) butirato, (C) EPM y (D) los ácidos salicílico y siquímico (3).

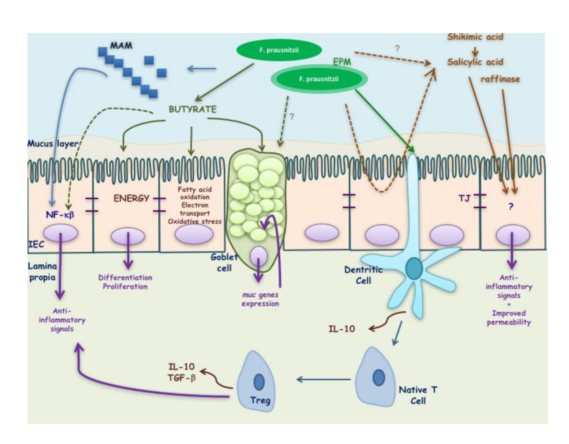


Figura 1: Efectores potenciales de *F. prausnitzii* y sus efectos sobre el huésped. Extraído de (3).

A pesar de su importancia en la salud humana, se han realizado pocos estudios microbiológicos para aislar nuevas cepas de *F. prausnitzii* con el fin de comprender mejor la biodiversidad y la diversidad fisiológica de esta especie comensal beneficiosa. En 2017, establecimos un protocolo para aislar nuevas cepas de *F. prausnitzii* de heces de voluntarios sanos, así como una caracterización molecular y metabólica detallada (4). Las cepas de *F. prausnitzii* aisladas se clasificaron en 3 grupos según las secuencias de ARNr 16S. La producción de enzimas, la resistencia a los antibióticos y las propiedades inmunomoduladoras fueron cepa-dependientes, aunque todos los aislados mostraron: i) ausencia de adhesión a células epiteliales, de plásmidos, y de actividad antimicrobiana y hemolítica, y ii) la presencia de actividad de ADNasa. Además, se observó una correlación entre la producción de butirato y la capacidad de inducir IL-10, una citocina antiinflamatoria, en células mononucleares de sangre periférica. En conjunto, estos resultados ponen en evidencia que varias de las cepas de *F. prausnitzii* aisladas pueden ser considerados como buenos candidatos como PNG. Entre ellas la cepa *F. prausnitzii* CNCM I-4573 ha sido seleccionada por la *Start-Up* francesa NexBiotiX con el fin de realizar un ensayo clínico en humanos en los próximos 3 años.

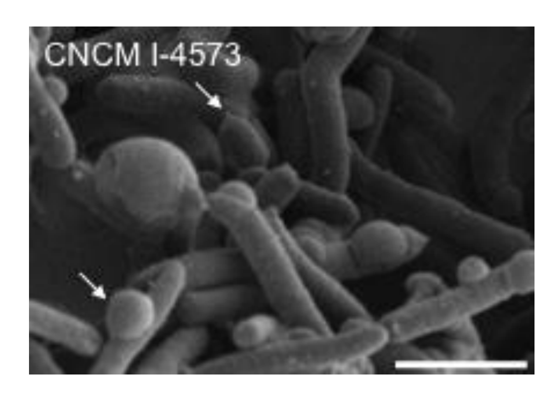


Figura 2: Imagen de microscopía electrónica de barrido de *F. prausnitzii* CNCM I-4573. Extraído de (4).

AGRADECIMIENTOS
Los autores quieren agradecer a todo el personal científico y técnico que ha participado en los estudios sobre F. praustnizii que se presentan en esta comunicación*, en particular a Harry Sokol y Sylvie Miquel.*

REFERENCIAS
[1] Miquel S. *et al. Microb Cell Fact.* **2015***, 14, 48.*
[2] Miquel S. *et al. Current Opinion Microbiol.* **2013**, 1, 7.
[3] Martín R. *et al. Front in Microbiol.* **2018**, *9*, 346.
[4] Martín R. *et al. Front in Microbiol.* **2017**, *8*, 1226.

DESARROLLO DE PROBIÓTICOS PARA LA HIPERURICEMIA

Garranzo M.[1], **Jara J.**[1] **Orgaz B.**[1], **Segura J.**[2], **Rodríguez J.M.**[3], **Fernández L.**[1]
1 Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Veterinaria/Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid.
2 Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Veterinaria/Departamento de Producción Animal. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid.
3 Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Veterinaria/Sección Departamental de Nutrición y Ciencia de los Alimentos (Veterinaria). Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid.
marcog03@ucm.es

El catabolismo de las purinas genera como producto final el ácido úrico[1]. El ácido úrico ejerce una función vital como el principal antioxidante de la sangre[1], pero su acumulación en el organismo produce hiperuricemia, tradicionalmente asociada como factor de riesgo de la gota[2]. En los últimos años también se ha puesto de manifiesto que la hiperuricemia es un factor de riesgo para la diabetes tipo II y para enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares[2]. El ácido úrico se elimina del cuerpo vía urinaria (70%) e intestinal (30%)[2]. El acúmulo patológico de ácido úrico se debe mayoritariamente a factores genéticos que inducen una excesiva síntesis o una insuficiente eliminación del mismo[2].
Los alimentos consumidos contienen purinas, y éstas se absorben a nivel intestinal, elevando el nivel sérico de ácido úrico tras su catabolismo. La ingesta de fructosa también incrementa este nivel[2]. Las personas con predisposición genética a padecer hiperuricemia deben de controlar su dieta, evitando consumir alimentos con alta concentración en purinas.
Actualmente existen medicamentos para el tratamiento de la hiperuricemia, aunque pueden presentar efectos secundarios en ciertos individuos[3]. Debido a esto, los probióticos se han propuesto como una alternativa y/o complemento a los medicamentos actuales. El probiótico adecuado debería reducir la absorción de purinas dietéticas y/o los niveles séricos de ácido úrico. Para este fin, se ha evaluado la capacidad de captar y degradar la guanosina, la inosina y el ácido úrico, además de algunas propiedades de interés para su empleo como probióticos, en una colección de 17 cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.
Inicialmente, la captación de purinas se determinó incubando las células con una solución de inosina o guanosina durante una hora a 37ºC y cuantificando mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la concentración de las purinas que no habían sido transportadas al interior celular. *Lactobacillus plantarum* ZL17 5 y cuatro cepas de *Lactobacillus salivarius* (TA143Ma1, V4II90, V7IV1 y ZL31 32) fueron las que presentaron mayor capacidad para captar estos compuestos. En general, la captación de inosina siempre fue mayor que la de guanosina, salvo en el caso de *L. salivarius* ZL31 32.
A continuación se evaluó en estas cinco cepas el efecto de la presencia de glucosa en la capacidad de captar las purinas, empleando una concentración celular menor. En todas las cepas se incrementó la capacidad de captación de las purinas (figura 1). *L. salivarius* V4II90 destacó en especial porque en presencia de glucosa llegó a captar prácticamente todas las purinas presentes en el medio, mientras que en ausencia de glucosa el porcentaje de purinas transportadas era inferior al 40%.

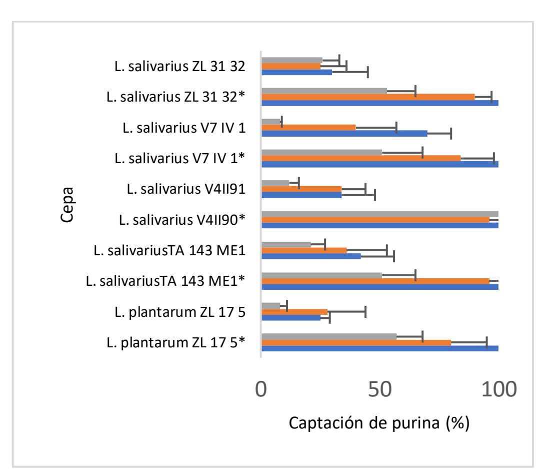


Figura 1. Captación de purinas en presencia (*) y ausencia de glucosa en el medio. Ácido úrico (gris), guanosina (naranja) y guanosina (azul).

Para determinar si estas purinas solo eran transportadas al interior de la célula o si también eran transformadas, se estudiaron los productos de degradación generados por extractos celulares. Para ello, en el ensayo se sustituyeron las células completas por extractos intracelulares obtenidos por rotura mecánica de las células. Los extractos celulares de *L. plantarum* ZL17 5, *L. salivarius* TA143Ma1 y *L. salivarius* ZL31 32 degradaron toda la inosina y guanosina, transformándolas en ácido úrico, xantina e hipoxantina. Tres cepas de *L. salivarius* (V4II90, V7IV1 y TA143Ma1) transformaron hasta el 50 % del ácido úrico. En el caso de *L. salivarius* V7IV1 y TA143Ma1 estos porcentajes coinciden con la captación de ácido úrico en presencia de glucosa, pero para *L. salivarius* V4II90 supone una reducción del 50% de la degradación con respecto a la captación.

En relación con otras propiedades de utilidad para un probiótico, se ha estudiado la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal mediante ensayos de supervivencia a pH ácido y a diferentes concentraciones de bilis así como la capacidad de formación de biofilms *in vitro* (técnica del carrusel). Todas las cepas sobrevivieron a las condiciones de acidez y bilis empleadas (Figuras 2 y 3). *L. salivarius* TA143Ma1 demostró tener la mayor resistencia a pH 2 mientras que *L. salivarius* V4II90 lo hizo frente a la presencia de 0,5 % (p/v) de bilis en el medio. Además, estas dos cepas mostraron las cinéticas de formación de biofilms más rápidas.

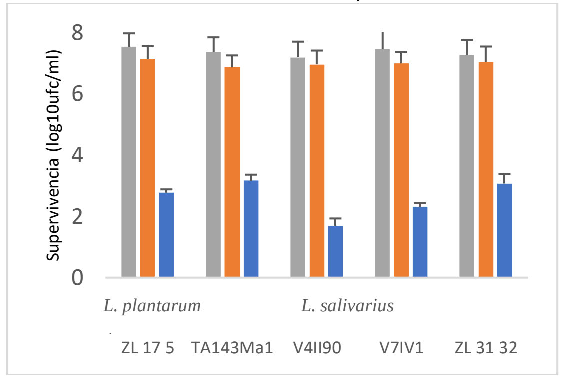


Figura 2. Supervivencia en el medio sin control de pH (gris), a pH 4 (naranja) y a pH 2 (azul).

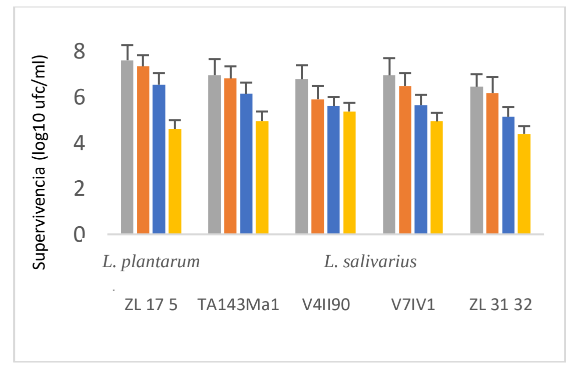


Figura 3. Supervivencia a diferentes concentraciones de bilis: control (azul), 0,1 % (naranja), 0,25 % (gris) y 0,5 % (amarillo).

En conclusión, *L. plantarum* ZL17 5, *L. salivarius* TA143Ma1, *L. salivarius* V4II90, *L. salivarius* V7IV1 y *L. salivarius* ZL31 32 son buenos candidatos para el futuro desarrollo de un probiótico para la hiperuricemia.

REFERENCIAS

[1] Kand´ár R, Záková P, Muzáková V. *CCATAR* **2006**; *365(1-2)*:249-256.
[2] Grassi et al., CPDEFP, **2013**, *19*, 2432-2438.
[3] Sánchez-Niño et al. *Clinical Kidney Journal.* **2017**, *10(5)*, 679-687.

PRODUCCIÓN DE UNA BEBIDA PROBIÓTICA A PARTIR DE ZUMO DE UVAS BLANCAS DE MESA

Guerra N.P., Domínguez J.M., Alonso E., Agregán, R., Bazán D.L.
Universidad de Vigo/Facultad de Ciencias de Ourense/Departamento de Química Analítica y Alimentaria/Las Lagunas s/n. CP 32004, Ourense
dbazan@uvigo.es

Aunque en general, los gránulos de kéfir se han venido utilizando como entidad fermentativa para la fermentación de diferentes tipos de leches (vaca, oveja, yegua, cabra y oveja) para la producción de kéfir, en los últimos años se han ensayado otros sustratos (suero lácteo, leches de soja, coco y nuez, zumos de zanahoria, hinojo, melón, cebolla, tomate y fresa) para la producción de diferentes productos funcionales [1].

Por esa razón, en el presente trabajo se realiza un estudio de la cinética de la fermentación del zumo de uvas blancas de mesa ("El Ciruelo", uva blanca dominga de categoría I, Alhama, Murcia, España) con gránulos de kéfir (Azkoyen Alimentos S.L., Vizcaya, España) para la producción de una bebida fermentada con un elevado contenido de células probióticas viables (principalmente bacterias lácticas y levaduras). El granulo se activó durante 24 h en leche de vaca entera UHT (La Asturiana, Asturias, España). Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado en régimen discontinuo, realizando 4 subcultivos (2,5 g de gránulo de kéfir/50 mL de zumo), a 20ºC y 150 rpm, con transferencias del gránulo a 50 mL de zumo fresco cada 24 h.

En el primer subcultivo (0-24 h), el pH disminuyó ligeramente desde 3,96 hasta 3,54, se produjeron 5,35 g de ácido láctico/L, y no se detectó ácido acético (Tabla 1).

El peso húmedo del gránulo aumentó desde 2,50 hasta 2,70 g y las concentraciones de las poblaciones de levaduras, BAL y BAC alcanzaron niveles de biomasa (entre $1,9x10^7$ y $2,4x10^7$ UFC/mL) muy similares (Fig. 1). Ello sugiere que las BAL y las BAC utilizaron los azúcares (fructosa y glucosa) para la producción de ácidos láctico y acético, respectivamente. Sin embargo, estos ácidos podrían haber sido asimilados por las levaduras (*e.g. S. cerevisiae*) presentes en el gránulo de kéfir [2].

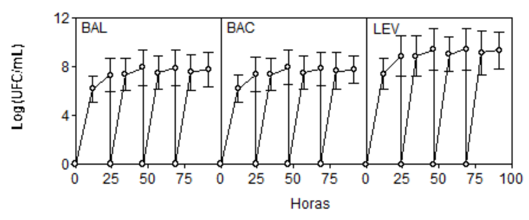


Figura 1: Evolución de las poblaciones de bacterias ácido lácticas (BAL), acéticas (BAC) y levaduras (LEV) en los diferentes subcultivos en zumo de uvas blancas. UFC: unidades formadoras de colonias.

La producción de glicerol alcanzó un nivel de 0,73 g/L, el nivel más bajo de todos los subcultivos (Tabla 1). Esta producción suele asociarse a las levaduras, pero se ha demostrado que algunas BAL pueden asimilar este compuesto [3], por lo que sería lógico suponer que la concentración final de glicerol sea el resultado de la diferencia entre la velocidad de producción por las levaduras y la velocidad de consumo por las BAL.

En el segundo subcultivo (24-48 h), el pH descendió desde 3,96 hasta 3,58, sin embargo, la concentración final de ácido láctico (2,41 g/L) fue 2,2 veces inferior (*P* <

0,05) a la obtenida (5,35 g/L) en el subcultivo anterior (Tabla 1).

Las producciones de biomasa libre (3,90 g/L), glicerol (5,03 g/L) y etanol (37,37 g/L) fueron superiores (*P* < 0,05) a las del subcultivo anterior (Tabla 1). Esto sugiere que ya, en esta etapa, las cepas del gránulo de kéfir estaban más adaptadas a la composición del mosto de uvas blancas. Probablemente por ello, se incrementaron (*P* < 0,05) los consumos de glucosa (93,2 %) y fructosa (77,4 %).

	Subcultivo I	Subcultivo II	Subcultivo III	Subcultivo IV
Biomasa	1,00 ± 0, 14a	3,90 ± 0,43b	3,35 ± 0,39b,c	3,98 ± 0,30b,c,d
Ácido láctico	5,35 ± 0,60a	2,41 ± 0,01b	0,77 ± 0,01c	ND
Glicerol	0,73 ± 0,27a	5,03 ± 0,65b	4,72 ± 0,34b,c	5,44 ± 0,33b,c,d
Etanol	15,74 ± 1,78a	37,37 ± 4,20b	43,47 ± 4,39c	47,12 ± 1,30c,d
Glucosa	20,51 ± 4,95a	3,23 ± 0,60b	3,24 ± 0,30b,c	3,07 ± 0,17b,c,d
Fructosa	61,07 ± 8,38a	18,72 ± 4,23b	8,42 ± 3,88c	7,40 ± 0,58c,d
pH final	3,54 ± 0,09a	3,58 ± 0,03a,b	3,70 ± 0,04a,c	3,69 ± 0,02c,d

Tabla 1: Niveles medios y desviación estándar (g/L) de las principales variables de cultivo al final de cada subcultivo. Las medias de cada variable (colocadas en filas) seguidas de la diferente letra son significativamente diferentes a *P* < 0,05.

El peso húmedo del gránulo se incrementó hasta 2,83 g/L y las concentraciones de levaduras, BAL y BAC viables al final del segundo subcultivo fueron $7{,}0\times10^7$, $8{,}1\times10^7$ y $7{,}0\times10^7$ UFC/mL, respectivamente (Fig. 1).

En el tercer subcultivo (48-72 h), la producción de ácido láctico (0,77 g/L) continuó con su tendencia descendente (*P* < 0,05), aunque el pH final descendió hasta 3,70 (Tabla 1).

El consumo de glucosa (93,2 %) se mantuvo constante (*P* > 0,05), pero el de fructosa se incrementó (89,8 %). Aunque los niveles de biomasa libre (3,35 g/L) y glicerol (4,72 g/L) fueron similares a los del subcultivo precedente (Tabla 1), la concentración final de etanol (43,47 g/L) aumentó (*P* < 0,05). Las concentraciones de levaduras, BAL y BAC viables al final de este subcultivo fueron $7{,}4\times10^7$, $7{,}8\times10^7$ y $6{,}7\times10^7$ UFC/mL, respectivamente (Fig. 1) y el peso húmedo del gránulo aumentó hasta 2,92 g.

En el último subcultivo (72-96 h), los niveles finales de pH (3,69), glucosa (3,07 g/L) y fructosa (7,40 g/L) y los consumos de ambas fuentes de carbono (93,2 % de glucosa y 91,1 % de fructosa), fueron muy similares a los del subcultivo anterior (*P* < 0,05).

Las producciones de biomasa libre (3,98 g/L), glicerol (5,44 g/L) y etanol (47,12 g/L) mostraron repuntes no significativos (Tabla 1) y no se detectó la producción de láctico.

El peso húmedo del gránulo se incrementó hasta 3,01 g (Tabla 1), mientras que las concentraciones de levaduras, BAL y BAC viables al final de este subcultivo fueron $6{,}0\times10^7$, $6{,}1\times10^7$ y $5{,}5 \times 10^7$ UFC/mL (Fig. 1).

En conclusión, el primer subcultivo se podría considerar como una nueva activación del gránulo y los restantes, como fermentaciones *batch* propiamente dichas. La bebida obtenida en los tres últimos subcultivos podrían utilizarse como bebidas probióticas (con elevada viabilidad: entre 10^7 y 10^8 UFC/mL) saludables (niveles finales de glucosa y fructosa < 4 g/L, láctico < 2,4 g/L, etanol ~ 6 % (v/v)) para la alimentación animal y/o humana.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al grupo de investigación de la Universidade de Vigo “Investigacións Agrarias e Alimentarias” (AA1) y a la agrupación estratégica de investigación de la Xunta de Galicia “Centro de Investigaciones Agro-Ambientales y Alimentarias” (CIA3) por su ayuda en la financiación del presente trabajo.

REFERENCIAS

[1] O. Corona, W. Randazzo, A. Miceli, R. Guarcello, N. Francesca, H. Erten, G. Moschetti, L. Settanni, *LWT-Food Sci. Technol.,* **2016**, *66*, 572-581.

[2] B. Cheirsilp, H. Shimizu, S. Shioya, *J. Biotechnol.,* **2003**, *100*, 43-53.

[3] G. Garai-Ibabe, I. Ibarburu, O. Claisse, A. Lonvaud-Funel, A. Irastorza, M.T. Dueñas, *Int. J. Food Microbiol.,* **2008**, *121*, 253-26.

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA MEDIANTE ANÁLISIS GENÓMICO DE 14 CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Rodrigo-Torres L.[1,2], Yépez A.[1,3], Aznar R.[1,2,3], Arahal DR.[1,2]
1 Universitat de València/Facultad de Biología/Departamento de Microbiología y Ecología. Edificio de Investigación. C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot (Valencia)
2 Universitat de València/Colección Española de Cultivos Tipo. C/Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna (Valencia)
3 Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (CSIC)/ Departamento de Conservación y Seguridad Alimentaria. C/ Catedrático Agustín Escardino 7, 46980 Paterna (Valencia)
lidia.rodrigo@uv.es

Los productos fermentados tradicionales de otras culturas presentan un gran potencial en biodiversidad, y por ello son objeto de investigación en la búsqueda de nuevas cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL) de interés biotecnológico [1]. Así, el estudio de la biodiversidad BAL asociada a dos productos fermentados tradicionales andinos de origen vegetal (chicha y tocosh) permitió la selección de 14 cepas, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (*Lb.*) y *Leuconostoc* (*Lc.*), por su capacidad para producir vitaminas (riboflavina, folatos) e inhibir microorganismos alterantes y patógenos. Para su posible aplicación en el diseño de alimentos funcionales, se determinó la ausencia de resistencias a antibióticos y de producción de aminas biógenas, mediante ensayos *in vitro* [2,3]. Ahora, este trabajo da un enfoque genómico a la evaluación de su seguridad alimentaria para complementar y completar la información fenotípica, teniendo en cuenta las recomendaciones de la EFSA para el uso de microorganismos como aditivos alimentarios y como organismos productores [4].

Material y métodos

Se exploraron los genes implicados en la producción de histamina, tiramina y putrescina (ruta de la agmatina y de la ornitina) usando BLAST y genes de referencia de los clústeres histidina descarboxilasa de *Lb. reuteri* (LN877767), tirosina descarboxilasa (NC_008497.1) y agmatina deiminasa (AF446085.5) de *Lb. brevis* y ornitina descarboxilasa de *Lb. rossiae* (KT020759). Se utilizó la herramienta *Resistance Gene Identifier* (RGI) de la *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) [5] para la detección de genes de resistencia a antibióticos (AMR). Se observó el entorno génico de los genes detectados mediante el servidor RAST. Se analizaron las secuencias CRISPR empleando el programa *CRISPRCasFinder* [6] y las secuencias de genes de profagos mediante el servidor PHASTER. Se utilizó la herramienta *PathogenFinder* para analizar la presencia de genes relacionados con patogenicidad. Este programa estima, además, la probabilidad de que la bacteria sea patógena en humanos. Los genes implicados en la síntesis de bacteriocinas se estudiaron mediante BAGEL4.

Resultados y discusión

La búsqueda de genes relacionados con la síntesis de aminas biógenas, mostró que todas las cepas carecen de los genes de los clústeres estudiados excepto dos cepas de *Lb. sakei*, CECT 9267 y CECT 9624, que

mostraron 1 y 5 genes, respectivamente, de los 6 genes del clúster de la agmatina deiminasa para la síntesis de putrescina.
El programa RGI de CARD predijo un gen de resistencia a aminoglucósidos en todas las cepas (gen AAC(6')-Ib7, en la cepa de *Lb. fermentum* y gen *aadA,* en el resto) pero ninguna de ellas presentó resistencia a estreptomicina, gentamicina y kanamicina en ensayos *in vitro* [2]. Estos genes se disponen en cassettes y son parte de un gran número de integrones, plásmidos y transposones [7]. La guía EFSA determina que, aunque la concentración mínima inhibitoria (MIC) de un antibiótico sea inferior al corte definido, si se encuentran genes AMR, debe evaluarse la posibilidad de su activación [4]. La localización aislada estos genes, como único gen del contig (o acompañado de un gen de proteína hipotética), impide determinar con certeza la probabilidad de dicha activación y de su transferencia horizontal.

Cepa	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Lb. fermentum						
CECT 9269 (T3M3b)	-	+	+	+	-	-
Lb. plantarum						
CECT 8962 (M5MA1)	-	+	+	+	-	-
CECT 8964 (M9MM4)	-	+	+	+	-	+
CECT 8963 (M9MM1)	-	+	+	+	-	+
CECT 8965 (M9MG6)	-	+	+	+	-	+
CECT 8966 (M9Y2)	-	+	+	+	-	+
Lb. sakei						
CECT 9267 (T3M7)	+	+	+	+	-	+
CECT 9624 (T3M3a)	+	+	+	+	-	-
Lc. mesenteroides						
CECT 9217 (T1M3)	-	+	+	+	-	+
CECT 9266 (T2MM5)	-	+	+	+	-	+
CECT 9268 (T2MM6)	-	+	-	+	-	+
Lc. suionicum						
CECT 8484 (M8MG2)	-	+	+	+	-	-
CECT 9496 (M8Y1)	-	+	+	+	-	-
CECT 9216 (M9MG2b)	-	+	+	+	-	-

Tabla 1: Resultados de la exploración genómica de genes implicados en la síntesis de aminas biógenas (1), AMR (2), secuencias CRISPR (3), secuencias de profagos (4), patogenicidad (5) y bacteriocinas (6). - ausencia de genes, + presencia de al menos un gen.

Todas las cepas tienen secuencias de fagos completos y, salvo *Lc. mesenteroides* CECT 9268, secuencias CRISPR. La presencia de CRISPR confiere inmunidad frente al ataque de fagos y da estabilidad al genoma.
De las 14 cepas estudiadas 8 mostraron clústeres de síntesis de bacteriocinas: 4 cepas de *Lb. plantarum* (plantaricina A, E, F, J, enterocina X cadena beta y lactococcina), 3 cepas de *Lc. mesenteroides* (enterocina X cadena beta, bacteriocina IIc), y 1 cepa de *Lb. sakei* (lactocina 705 alfa y beta).

Conclusiones

Las 14 cepas con potencial probiótico estudiadas no poseen genes relacionados con patogénesis en humanos y aunque se encontraron genes de resistencia a antibióticos, ninguna de ellas presentaba resistencia a aquellos que son diana de los enzimas codificados por dichos genes. La capacidad de síntesis de putrescina en las dos cepas de *Lb. sakei* se deberá confirmar *in vitro*. La inestabilidad genómica que puede suponer la presencia de profagos se contrarresta con la de secuencias CRISPR y genes *cas* en la mayoría de cepas. Por tanto, al menos 12 de las 14 cepas reúnen los requerimientos de seguridad alimentaria para su posible aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por el proyecto "Alimentos vegetales con funcionalidad probiótica para poblaciones infantiles desnutridas (ProInfant). CYTED Ref: 917PTE0537, MINECO Ref: PCIN-2017-003 e INIA Ref: RMP2015-00001-00-00.

REFERENCIAS

[1] JP Tamang, et al. *Front Microbiol*, **2016**, *7*, 578.
[2] A Yépez, et al. *Food Control*, **2017**, *78*, 393-400.
[3] E Jiménez, et al. *Food Sci Technol*, **2018**, *87*, 567-574.
[4] *EFSA Journal*, **2018**, *16*, 5206.
[5] CARD, https://card.mcmaster.ca/. Accessed: June 2018
[6] CRISPRCasFinder, https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index. Accessed: June 2018
[7] MS Ramirez, ME Tolmasky, *Drug Resist Updat*, **2010**, *13*, 151-171.

IN SILICO PLASMID INSIGHTS INTO PROBIOTIC AND SAFETY ASPECTS OF A POTENTIALLY PROBIOTIC *LACTOBACILLUS PENTOSUS* MP-10 ISOLATED FROM BRINES OF NATURALLY FERMENTED ALOREÑA GREEN TABLE OLIVES

Abriouel H[1], Caballero Gómez N[1], Pérez Montoro B[1], Alonso E[1], de la Fuente Ordóñez J.J.[1], Gálvez A[1], Benomar N[1]

Universidad de Jaén/Facultad de Ciencias Experimentales/Departamento de Ciencias de la Salud Campus las Lagunillas s/n, cp. 23071-Jaén.

hikmate@ujaen.es

Lactobacillus pentosus MP-10 isolated from brines of naturally fermented Aloreña green table olives exhibited high probiotic potential. The genome sequence of *L. pentosus* MP-10 is currently considered the largest genome among lactobacilli, highlighting the microorganism's ecological flexibility and adaptability. Here, we analyzed the sequences of five plasmids (pLPE-1, pLPE-2, pLPE-3, pLPE-4 and pLPE-5 ranging 29-46 kb) from *L. pentosus* MP-10 for the presence of probiotic determinants and safety aspects to explore its putative safety and its functionality in food and host. Bioinformatic analyses of the annotated plasmid sequences revealed the presence of genes coding for funcional and probiotic activities such as genes coding for carbohydrate metabolism, toxin degradation, adhesion, stress response and adaptation to brine-associated niches. Furthermore, *in silico* analysis of five plasmids revealed the absence of acquired antibiotic resistance genes and virulence determinants in *L. pentosus* MP-10. Thus, *L. pentosus* MP-10 could be considered safe and with high probiotic potential, which could facilitate its application as a starter culture and probiotic in food preparations.

Introduction

Lactobacillus pentosus MP-10 isolated from brines of naturally fermented Aloreña green table olives (Abriouel et al., 2012) exhibited high probiotic potential such as resistance to low pH (1.5), tolerance to high concentrations of bile salts (4%), antimicrobial activity, good ability to auto-aggregate and co-aggregate with pathogenic bacteria, adherence to intestinal and vaginal cell lines besides its ability ferment several carbohydrates and also prebiotics (Pérez Montoro et al., 2016).

Along with the probiotic features of some lactobacilli strains, aspects of food safety should be considered as both properties are inherently linked to the specific strains and host susceptibility. Thus, the safety aspects and probiotic properties of *L. pentosus* MP-10 is of great importance with regards to its future application as probiotic. In this sense, bioinformatic tools could provide a greater sense of the microorganism's safety and functionality in food preparations.

Materials and methods

Analysis *in silico* of safety and probiotic aspects in *L. pentosus* MP-10 plasmids. The genome sequence of *L. pentosus* MP-10 consisted of a single circular chromosome of 3,698,214 bp, with an estimated mol% G+C content of 46.32% and 5 plasmids ranging 29-46 kb (accession numbers FLYG01000001 to FLYG01000006) (Abriouel et al., 2016). In this study, the sequences of five plasmids (pLPE-1, pLPE-2, pLPE-3, pLPE-4 and pLPE-5) from *L. pentosus* MP-10 were annotated (Abriouel et al., 2016,

2017). The annotated plasmid sequences were screened for safety aspects (antibiotic and virulence determinants) and probiotic features.

Results and discussion

General features of *L. pentosus* MP-10 plasmids: The average GC content of *L. pentosus* MP-10 plasmids was ranging 39.52-42.50%, being slightly lower than the host chromosome (GC value of 46.32%) (Fig. 1). Furthermore, the GC content of *L. pentosus* MP-10 plasmids was among the highest of the available *L. pentosus* plasmids.

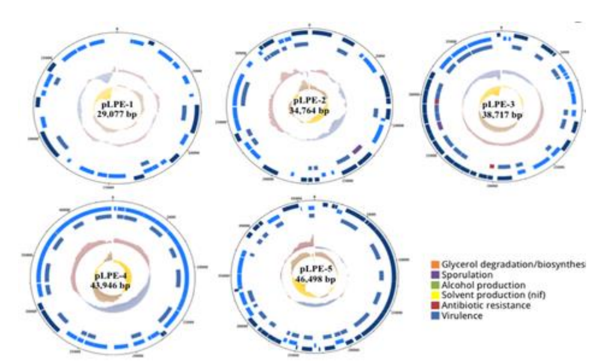


Figura 1: Circular representation of the *Lactobacillus pentosus* MP-10 plasmids.

In silico analysis of safety aspects in *L. pentosus* MP-10 plasmids: To predict the complete resistome from *L. pentosus* MP-10 genome, including resistance genes and mutations conferring antibiotic resistance, we used the Resistance Gene Identifier (RGI) tool available in the recent updated CARD database (Jia et al., 2017), which revealed the absence of antibiotic resistance determinants.

Regarding the possibility of acquired resistance by horizontal gene transfer, ResFinder did not detect any acquired antibiotic resistance genes for aminoglycoside, beta-lactam, colistin, fluoroquinolone, fosfomycin, fusidic acid, MLS-series (macrolide, lincosamide and streptogramin B), nitroimidazole, oxazolidinone, phenicol, rifampicin, sulphonamide, trimethoprim, tetracycline and glycopeptide (data not shown).

On the other hand, the BLAST search against a virulence gene database (PHAST) revealed the absence of virulence determinants in *L. pentosus* MP-10 plasmids.

In silico analysis of probiotic features in *L. pentosus* MP-10 plasmids: BLAST search was conducted for each annotated element of *L. pentosus* MP-10 plasmid sequences. The results obtained showed the presence of genes coding for carbohydrate metabolism, toxin degradation, adhesion, stress response and adaptation to brine-associated niches.

Conclusion: *in silico* analysis of five plasmids revealed that *L. pentosus* MP-10 could be considered safe and with high probiotic potential, which could facilitate its application as a starter culture and probiotic in food preparations.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge research grants: AGL2013-43571-P (Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO, FEDER), UJA2014/07/02 (Plan Propio UJA) and Research Team (EI_BIO01_2017).

REFERENCES

[1] H. Abriouel, N. Benomar, A. Cobo, N. Caballero, M.A. Fernández Fuentes, R. Pérez-Pulido, A. Gálvez, *Food Microbiol,* **2012**, *32*, 308–316.

[2] H. Abriouel, B. Pérez Montoro, M.C. Casado Muñoz, L. Lavilla Lerma, M. Hidalgo Pestaña, N. Caballero Gómez, et al. *Genome Announc.* **2016**, 4(5), e00854–16.

[3] H. Abriouel, B. Pérez Montoro, C.S. Casimiro-Soriguer, A.J. Pérez Pulido, C.W. Knapp, N. Caballero Gómez, S. Castillo-Gutiérrez, M.D. Estudillo- Martínez, A. Gálvez, N. Benomar, *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 891.

[4] B. Jia, A.R. Raphenya, B. Alcock, N. Waglechner, P. Guo, K.K. Tsang, et al., *Nucleic Acids Res.* **2017**, 45, D566–D573.

[5] B. Pérez Montoro, N. Benomar, L. Lavilla Lerma, S. Castillo Gutiérrez, A. Gálvez, H. Abriouel, *Front. Microbiol.* **2016**, 7, 1583.

BILE-INDUCED PROMOTERS FOR GENE EXPRESSION UNDER GASTROINTESTINAL CONDITIONS IN *LACTOBACILLUS* STRAINS

Arqués J.L., Peirotén A., Martínez-Fernández J.A., Bravo D., Langa S., Landete J.M.
Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Carretera de La Coruña Km 7.5, 28040. Madrid
landete.josem@inia.es

Bioengineering of probiotics allows the improvement of their beneficial characteristics. Here, we explore a new molecular tool that allows the activation of desirable traits of probiotics once they reach the intestine. The activity of upstream regions of bile-inducible genes of *Lactobacillus casei* BL23 and *Lactobacillus plantarum* WCFS1 was analysed using plasmids encoding an anaerobic fluorescent protein as reporter. Our results confirmed bile-induction of two of the promoters tested in *Lb. casei* BL23, resulting in the selection of the promoter P16090. *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus reuteri* strains transformed with a plasmid containing this promoter also showed induction in the presence of bile salts. However, induction did not occur in *Lactococcus lactis* MG1363 or *Bifidobacterium* transformants. Studies with different bile compounds revealed the importance of cholic acid in this bile-induction process. Detection of fluorescence induction was confirmed in transformed *Lb. casei* BL23 when cultured under intestinal conditions and in the presence of intestinal microbiota. The developed vector pNZ:16090-aFP is a promising tool suitable for the expression of genes of interest under intestinal conditions in probiotic lactobacilli such us *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* and *Lb. reuteri*.

Introduction

The application of bioengineering techniques opens new possibilities to improve probiotic strains [1]. The control of the gene expression under gastrointestinal conditions would make possible to obtain improved effects once the probiotic is in the intestine, without affecting their behaviour during the production phase. One possible trigger to this controlled expression is bile, which appears in the gastrointestinal tract once the food reaches the intestine. The mechanism of response to bile has been studied in lactobacilli, and several bile-induced genes have been described [2,3].

Results and discussion

Three putative promoters of bile-inducible genes from *Lb. casei* BL23 and *Lb. plantarum* WCFS1 were incorporated into a plasmid encoding the anaerobic cyan-green fluorescent protein evoglow-Pp1 as reporter and used to transform *Lb. casei* BL23. The promoter P16090 was selected because it showed the strongest bile-induction (Figure 1).

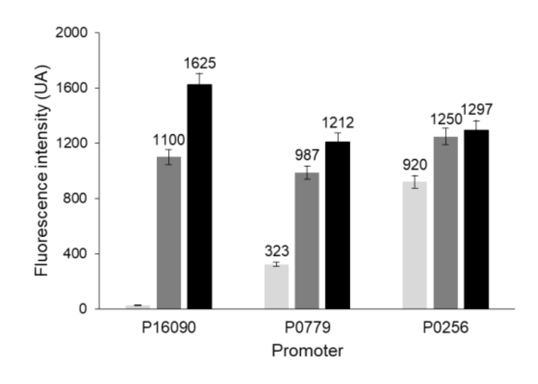


Figure 1. Fluorescence mean values obtained from *Lb. casei* BL23 transformed with plasmids containing each promoter and grown without bile (light gray), with 0.1 % (dark gray) and 0.2 % of bile (black).

To analyse whether promoter P16090 could work in different strains of lactobacilli and bifidobacteria as well as the effect of using different bile compounds or under intestinal conditions, new fluorescent induction assays were performed. *Lb. rhamnosus* INIA P232, *Lb. rhamnosus* INIA P426 and *Lb. reuteri* INIA P572, harboring the plasmid pNZ:16090-aFP showed a notable induction by bile salts, with similar fluorescence emission to that of *L. casei* BL23 16090-aFP in the case of the two *Lb. rhamnosus* strains (Figure 2).

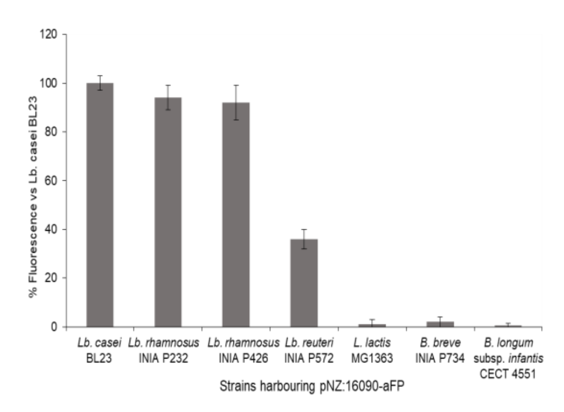


Figure 2. Fluorescence induction by 0.05 % bile. Comparison of bacterial strains harbouring the plasmid pNZ:16090-aFP.

The influence of several concentrations of bile compounds (ox-bile, cholic acid, sodium-glycodeoxycholate, taurodeoxycholic acid, taurocholic acid and glycocholic acid) was analyzed. The *Lactobacillus* strains showed different levels of induction with each compound. In general, the fluorescence increased with the concentration of the bile compounds, although not in a linear manner and restrained by the growth-inhibiting effect of the compounds. In order to test bile-induction under intestinal conditions, *Lb. casei* BL23 16090-aFP was co-cultured with human fecal microbiota with and without bile salts. The expected fluorescence induced by bile during the co-culture was maintained over time during the growth in MRS plates without bile.

Our findings show that the selected promoter P16090 from *Lb. casei* B23 induces high expression levels in *Lb. casei* and *Lb. rhamnosus*. The fluorescence level induced by this promoter in *Lb. reuteri* was less than a half than that obtain in *L. casei*, while no induction was observed in the non-lactobacilli strains tested. Induction or repression mechanisms of gene expression are highly regulated by the cellular machinery [4], and response to bile is likely to be mediated by two-component systems in gram-positive bacteria. A possible explanation for the different induction levels observed for P16090 in each strain could be due to the existence of differences in the regulatory part of the two-component system signalling the presence of bile, which could have reduced affinity for the promoter sequence of not related genera or species. In the same way, it could explain why the two bile-inducible promoters from *Lb. plantarum* WCFS1 did not achieve the same induction in *Lb. casei* BL23 as the promoter coming from the same strain. Therefore, for each species, or even each strain, it could be a good approach to look for its own inducible promoters, which would fit better with their own cellular regulatory machinery. Nevertheless, the pNZ:16090-aFP plasmid worked well in strains of species closely related to *Lb. casei* like *Lb. rhamnosus* and, to a lesser extent, in less related ones, like *Lb. reuteri*.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by project RM2012-00004-00-00 and RTA2013-00029-00-00 from the MINECO.

REFERENCES

[1] D Bravo, JM Landete. *Biotechnol. Genet. Engin. Rev.* **2017**, *33*: 173-189.

[2] C Alcántara, M Zúñiga M. *Microbiol.* **2012,** *158*: 1206–1218.

[3] PA Bron D Molenaar, WM de Vos, M Kleerebezem, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*: 728-738.

[4] JM Landete. *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*: 770-780.

EFECTO DE LOS *BIOFILMS* PREFORMADOS POR LACTOBACILOS PROBIÓTICOS SOBRE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN DE *LISTERIA* SPP.

Jara Pérez J., Garranzo Asensio M., Fernández L.[1], Rodríguez J.M.[2], Orgaz B.[1]
1 Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040, Madrid. España.
2 Sección Departamental de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040, Madrid. España.
josujara@ucm.es

Introducción

Las biopelículas o *biofilms* son comunidades microbianas, formadas por células embebidas en una matriz extracelular (97% agua y 3% parte sólida, donde el 85% son exopolisacáridos y el resto células, ADN y proteínas), que se encuentran adheridas a las superficies tanto bióticas como abióticas. En estas comunidades mixtas, cabe la posibilidad de que convivan distintos géneros bacterianos, especies y cepas.

Esta matriz sirve como soporte estructural, mecanismo de defensa y aporte nutricional a las bacterias. En general, estas formas de vida son más resistentes que las células en suspensión o células planctónicas, de ahí su importancia en entornos alimentarios y clínicos, en los cuales es crítico minimizar, en la medida de lo posible, su presencia. Su organización y estructura dependen de los microorganismos que los formen, por lo que es necesario su estudio para conocer el comportamiento de los mismos en comunidades mixtas.

El empleo de microorganismos probióticos como estrategia *anti-biofilm* se ha propuesto por muchos autores que observaron cómo ciertas especies y cepas de bacterias eran capaces de ejercer un papel beneficioso para la salud, a la vez que competían directamente con bacterias patógenas, desplazando su crecimiento cuando lo hacían simultáneamente. Así, en este trabajo se propone el "acondicionamiento" de superficies con biofilms de microorganismos probióticos para modular la adhesión de patógenos.

Objetivos

I. Evaluar la capacidad de formación de biofilms de bacterias probióticas, en concreto de, *Lactobacillus fermentum* ZL 26-21 y *Lactobacillus salivarius* AP14/Me2.

II. Evaluar la capacidad de formación de biofilms de varias especies del género *Listeria* spp.

III. Evaluar la capacidad de adhesión de *Listeria* spp. sobre biofilms preformados por los microorganismos probióticos estudiados.

Material y Métodos

Desarrollo de los biofilms bacterianos

Tras la revitalización de las cepas desde su stock congelado, los cultivos se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en medio fresco. Tras esto, la absorbancia (A_{600nm}) del cultivo se ajustó a 0.15, equivalente a una densidad celular de 10^7 ufc/mL.

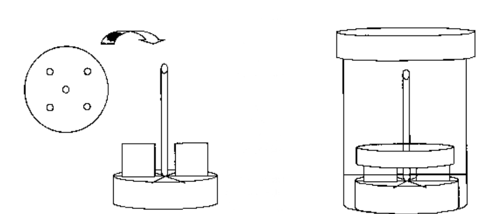


Figura 1: Estructura del carrusel (Imágenes pertenecientes al grupo de investigación FOREVER).

200 μl de esta suspensión bacteriana se utilizaron para inocular los carruseles que contenían 60 ml de medio fresco (Figura 1). Como sustrato de adhesión se emplearon cupones de vidrio de 22 x 22 mm, o bien limpios, o bien con un biofilm preformado de 24h de las cepas probióticas.
La población adherida se determinó a lo largo del tiempo rascando las células de los cupones y sembrando en medios selectivos.

Determinación de la superficie ocupada
Los cupones con el biofilm se tiñeron con Azul de Coomassie. Estas muestras (Figura 2) se escanearon, se binarizaron y con la ayuda del programa ImageJ se obtuvo el % de superficie ocupada.



Figura 2: Cupón teñido con Azul de Coomassie de una muestra de *L. fermentum* de 24 horas.

Determinación de la biomasa adherida
Los cupones teñidos, se decoloraron con etanol 96% y se determinó la A_{525nm} de la solución obtenida en el espectrofotómetro.

Análisis de imagen mediante CLSM
Se obtuvieron imágenes de los biofilms formados mediante microscopía confocal (CLSM) con el microscopio FLUOVIEW® FV 1200 (OLYMPUS).

Resultados
Lactobacillus fermentum ZL 26-21 y *Lactobacillus salivarius* AP14/Me2 fueron capaces de formar densos biofilms a las 24 h. Además, en términos de superficie ocupada y biomasa, ambas cepas se comportaron de forma similar.

Las imágenes de CLSM de las estructuras de los biofilms formados por dichas cepas, fueron similares, presentando un espesor máximo medio de 7 micras. Se observaron agregados bacterianos rodeados por una matriz extracelular, cuya proporción aumentaba con el tiempo.

La capacidad de adhesión de *Listeria innocua* ATTC 50109 sobre los biofilms preformados de *L. fermentum* ZL 26-21y *L. salivarius* AP14/Me2 no solo no resultó inhibida, sino que se observó una estimulación de la misma. De hecho, se observó un aumento de la densidad celular de *Listeria innocua* ATTC 50109 en el biofilm con respecto al biofilm monoespecie. Igualmente, la presencia de *L. fermentum* y *L. salivarius* en las superficies favoreció, aunque en menor medida, la capacidad de adhesión de *L. monocytogenes*. Esto podría indicar que la matriz o bien algunos metabolitos producidos por los lactobacilos, y que quedan retenidos en ella, podrían estimulan la adhesión de ambos microorganismos.

Así, el empleo de microorganismos probióticos como estrategia anti-biofilm se debe considerar caso por caso, ya que no se puede descartar que determinadas cepas estimulen la adhesión de microorganismos potencialmente patógenos.

AGRADECIMIENTOS
Este trabajo ha sido financiado con el proyecto Proyecto AGL 2016-75476-R del MINECO. Al CAI de Microscopía de la UCM por el soporte para la adquisición de imágenes de CLSM.

REFERENCIAS
[1] Flemming, H.C; Wingender, J; Szewzyk, U; Steinberg, P; A. Rice, S; Kjelleberg, S. *Nature reviews* **2016***, 14*, 563-575.
[2] Ashutosh Kumara; Anwar Alama; Mamta Rani; Nasreen Z. Ehtesham; Seyed E. Hasnain. *Int. J. Med. Microbiol.* **2017**, *307*(8), 481-489.
[3] Aleksandra M. Kocot; Magdalena A. Olszewska. *LWT*. **2017**, *84*, 47-57.

DETECCIÓN DE AMINAS BIÓGENAS Y FACTORES DE VIRULENCIA EN ENTEROCOCOS AISLADOS DE HECES DE RATÓN TRAS DIFERENTES DIETAS

Sánchez B.[1], Cobo A.[1], Hidalgo M.[1], Prieto I.[2], Martínez A.M.[3], Gálvez A.[1], Martínez Cañamero M.[1]

1 Universidad de Jaén, Departamento de Ciencias de la Salud, Área de Microbiología. Paraje de Las Lagunillas s/n 23071 Jaén

2 Universidad de Jaén, Departamento de Ciencias de la Salud, Área de Fisiología. Paraje de Las Lagunillas s/n 23071 Jaén

3 Universidad de Jaén, Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Paraje de Las Lagunillas s/n 23071 Jaén

canamero@ujaen.es

La biodiversidad microbiana del sistema gastrointestinal está determinada por las interacciones de los microorganismos simbiontes, que a su vez dependen de la genética del huésped y de la dieta a la que éste está expuesto. Los microorganismos tratarán de contrarrestar la capacidad de autorregulación del sistema, se adaptarán a los alimentos y competirán por los recursos, defendiéndose contra productos químicos o proteínas agresivas, lo que hará que muchos de estos grupos de bacterias desarrollen estrategias y mecanismos de defensa. Uno de estos mecanismos es la expresión de factores de virulencia que pueden causar condiciones clínicas graves en el huésped.

En este estudio, investigamos si una dieta rica en ciertas grasas puede fomentar o inhibir ciertas cepas que pueden ser perjudiciales para el hospedador. En el marco de una investigación previa sobre el efecto del aceite de oliva virgen extra (AOVE) y otras grasas sobre la microbiota intestinal de ratones [1], aislamos una colección de cepas de enterococos. El género *Enterococcus* es ampliamente conocido por su presencia en alimentos y en la ruta oral-fecal y su papel y seguridad siguen siendo fuente de controversia [2]. Nuestro objetivo ha sido llevar a cabo un estudio de seguridad de las bacterias obtenidas, incluyendo también la producción de aminas biógenas, así como determinar si existían diferencias entre los enterococos de las diferentes dietas.

Las cepas se consiguieron a partir de muestras fecales de ratones sometidos a tres tipos diferentes de dietas altas en grasa (20%), enriquecidas respectivamente en mantequilla (M), aceite de oliva refinado (AOR) y aceite de oliva virgen (AOVE), así como un grupo con dieta estándar (SD) [1]; y fueron obtenidas al inicio de la investigación, a las seis y a las doce semanas, caracterizándose mediante las correspondientes pruebas bioquímicas y genéticas. A partir de estas cepas se obtuvo ADN mediante el método de fenol-cloroformo y se realizaron PCRs específicas para identificar diferentes genes de patogenicidad asociados a *Enterococcus* (*agg, gelE, cylA, cylB, cylM, esp, efaAfs, efaAfm, cpd, cob, ccf*) [3] y distintas aminas biógenas (*hdc1, hdc2, tdc, odc*) [4].

A lo largo del experimento obtuvimos una colección de enterococos que, tras llevar a cabo genotipado, quedó reducida a 52 cepas pertenecientes a seis especies diferentes. La presencia de factores de virulencia fue residual en todos los casos excepto para la proteína de superficie enterocócica (*esp*) que estaba presente en un 60% de las cepas. Aunque la principal

diferencia observada desde el comienzo fue la incapacidad de aislar enterococos a tiempo final a partir del AOVE, una tabla de contingencia no mostró diferencias significativas globales entre los otros grupos con respecto a la presencia de factores de patogenicidad, ni encontramos diferencias a lo largo del tiempo con esta variable. Sin embargo, como se muestra en la figura 1, sí se pudo observar una tendencia diferente en la presencia del gen *esp* entre la dieta estándar (SD) y las dietas altas en grasa, especialmente a mitad del experimento, con mayor convergencia en las cepas aisladas al final.

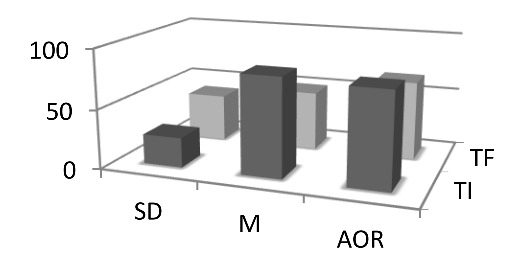


Figura 1: Porcentaje de cepas positivas para el gen *esp* aisladas a tiempo intermedio (TI) y tiempo final (TF). SD, dieta estándar; M, dieta alta en mantequilla; AOR, dieta alta en aceite de oliva refinado.

En el caso de las aminas biógenas, no encontramos ningún positivo en *hdc1, hdc2* y *odc*, pero hubo un 60% de positivos con el gen *tdc*, distribuidos en las tres dietas no-AOVE. Tampoco hubo diferencias globales al comparar las distintas dietas tras realizar una tabla de contingencia pero encontramos una tendencia importante con significación al 10% (Chi cuadrado con $p<0.1$) en la presencia de genes de producción de aminas a las 12 semanas en comparación con el inicio del experimento (figura 2). Si bien este resultado no fue confirmado de nuevo al realizar un test exacto de Fisher ($p=0.13$), seguimos pensando que es una tendencia importante a ser tenida en cuenta y que un mayor número de datos confirmaría la hipótesis.

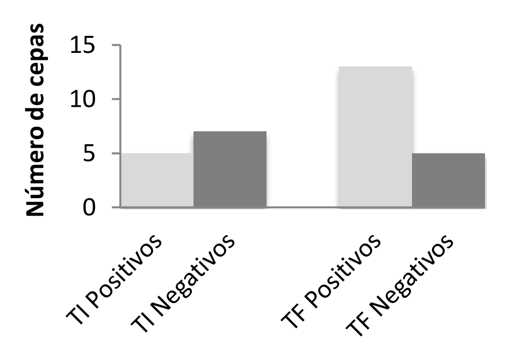


Figura 2: Distribución de cepas positivas y negativas para el gen *tdc* a tiempo inicial (TI) y final (TF)

Aún cuando se trata de un modelo murino y que es un estudio preliminar que requiere ampliar el número de datos para mejorar la significación, nuestros resultados abren la puerta a un enfoque diferente sobre la relación hospedador-seguridad alimentaria, donde la dieta es estudiada como posible fuerza selectiva de nuestros simbiontes intestinales, favoreciendo a aquellos que nos benefician o por el contrario, a los que nos son perjudiciales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado por la CEICE-JA (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340 y equipo de investigación AGR230).

REFERENCIAS

[1] M Hidalgo, I Prieto, H Abriouel, A Cobo, N Benomar, A Gálvez, M Martínez-Cañamero, *Food Res Int*, **2014**, *64*, 553-559.

[2] A Cobo Molinos, H Abriouel, NB Omar, RL López, A Galvez, *Int J Food Microbiol*, **2008**, *126*, 123-126.

[3] TJ Eaton, MJ Gasson, *Appl Environ Microbiol,* **2001**, *67*, 1628-1635.

[4] R Pérez-Pulido, H Abriouel, N Ben Omar, R Lucas, M Martínez-Cañamero, A Gálvez, *Food Chem Toxicol*, **2006**, *44*, 2070-2077.

SESIÓN 4B. NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

PROCESADO MEDIANTE NUEVAS TECNOLOGÍAS: VALIDACIÓN Y VISIÓN DE FUTURO

M.C. Pina Pérez
Institute of Life Technologies/Departamento Food Natural Products/HES.SO VALAIS-WALLIS/ Rue du Rawil, 64, 1950 Sion, Switzerland
maria.pinaperez@hevs.ch

Resumen: El procesado de alimentos es una de las técnicas ligadas a la alimentación más usadas desde la antigüedad. Los principales objetivos del procesado de alimentos son la seguridad microbiológica, la conservación y estabilidad del producto a lo largo del tiempo, la mejora en aspectos como la digestibilidad, la palatabilidad, o la transformación final del producto. La optimización de las condiciones de tratamiento para alcanzar el equilibrio deseado en cuanto a la consecución de dichos objetivos ha sido tarea fundamental y reto de procesadores y científicos de todo el mundo a través de los años. En este camino, y desde hace décadas, NUEVAS TECNOLOGIAS para el tratamiento de los alimentos emergen y se consolidan en el mercado, como alternativa a tratamientos convencionales, ofreciendo ventajas respecto a los mismos en cuanto a mejora nutricional, alta eficiencia y sostenibilidad (bajo consumo energético; baja o nula generación de residuos), y mejora de competitividad (nuevas posibilidades en la I+D+I de nuevos productos). Sobre estas tecnologías se apoya la innovación y la búsqueda de soluciones de futuro para la alimentación de una sociedad cambiante que deberá enfrentar problemas relacionados con el agotamiento de recursos, la sobrepoblación, el cambio climático y la aparición de nuevas enfermedades.

Procesos como las Altas Presiones Hidrostáticas (HHP), los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEF), o el tratamiento mediante la tecnología del Plasma Frío (Cold Plasma, CP) son de los procesos más innovadores y con mejores perspectivas de futuro en el procesado de NUEVOS ALIMENTOS. Desde principios del siglo XX las tecnologías de HHP y PEF comienzan a ser planteadas para el tratamiento mínimo (< 50 °C) de productos sensibles, fundamentalmente frutas, hortalizas y productos lácteos. Niveles adecuados de seguridad microbiológica (Food Safety Objectives, FSO), y una mejora de la calidad (vitaminas, proteínas, funcionalidad, aroma, sabor, textura) del producto final respecto al tratado térmicamente, son ya una realidad en el mercado para productos de alto valor añadido procesados mediante ambas tecnologías, cárnicos (HHP), zumos (HHP y PEF) y platos preparados (HHP).

Alimentos funcionales, suplementos nutracéuticos, cereales infantiles parcialmente hidrolizados, aislados proteicos dirigidos a grupos de población específicos, son algunos ejemplos de productos en polvo, un sector en auge, integrado por productos de elevado valor nutricional, cuyos factores de calidad deben ser preservados. Nuevas propuestas asociadas a la explotación de macro y microalgas, legumbres, o la utilización de insectos como fuentes proteicas alternativas a la proteína de origen animal, se vislumbran en el desarrollo de nuevos alimentos/ingredientes en polvo. A pesar de las muchas ventajas asociadas a este tipo de productos (fácil transporte, estabilidad, reducido volumen, bajo coste), hasta la fecha no existe un proceso conocido en la esterilización efectiva de productos en polvo. Para el tratamiento de

estos alimentos, emerge como prometedora la tecnología de PLASMA FRIO que se encuentra hoy en estadio inicial de desarrollo para su aplicación en alimentos. El plasma, definido como el cuarto estado de la materia, está compuesto por iones (positivos y negativos), electrones libres, radicales, radiación electromagnética de diversa longitud de onda (fotones UV y luz visible), con efectividad en la inactivación de bacterias, incluidas esporas, virus, y micotoxinas [1]. Importantes esfuerzos en evaluación de riesgos, modelización matemática de resultados, y la obtención de cinéticas de conservación para factores de calidad (vitaminas, proteinas, polifenoles) son todavia necesarios para implantar esta tecnologia a corto-medio plazo. El reto de la esterilización de productos en polvo mediante plasma, es uno de los escenarios de estudio de mayor interés en nuestros dias [2].

El incremento en la biodisponibilidad de compuestos funcionales en alimentos, el escaso o nulo impacto negativo en factores nutricionales/sensoriales (vitaminas, proteínas, color, sabor, aroma), versatilidad en la adaptación e implementación a nivel industrial, efectividad en la transformación de productos mejorando propiedades tecnológicas de componentes específicos: (p.e. texturización de proteínas vegetales), desarrollo de productos de alta conveniencia, *tailor-made,* así como la reducción del potencial alergénico asociado a determinados alimentos, son algunos de los campos de investigación en los que avanza el conocimiento sobre estas tecnologías, contribuyendo de esta manera a mejorar la salud de la población a través de la dieta, y el desarrollo de alimentos por y para todos.

Todos los productos resultantes de la aplicación de tecnologias de vanguardia deben ser evaluados de acuerdo al Reglamento (UE) 2015/2283, del 1 de Enero de 2018, relativo a NUEVOS ALIMENTOS, siendo seguros para el consumidor. En la validación de dichas tecnológicas emergentes, también nuevas técnicas y modelos se ponen al servicio de la ciencia. Evaluar de forma rápida y fiable la seguridad y funcionalidad de los productos sometidos a nuevos procesos es objetivo último antes del escalado. El modelo animal *Caernohabditis elegans* es uno de los modelos *in vivo* más facilmente manejables a nivel de labortorio, transparente, y cuya similitud al ser humano (nervios, tracto digestivo, producción de células reproductivas) en epitelio intestinal, facilita enormemente la evaluación de toxicidad, bioactividad y biodisponibilidad asociadas a nuevos alimentos procesados mediante NUEVAS TECNOLOGIAS [3; 4].

Se espera una NUEVA ERA de alimentos en cuyo procesado las tecnologias emergentes tengan un papel principal, para ganratizar la seguridad, el valor nutricional y la competitividad de los productos desarrollados (sin límites en espacio y tiempo), siendo sostenibles (en proceso, producto, y residuo cero).

AGRADECIMIENTOS
La Dra. Pina-Perez agradece a la Comisión Europea la financiación recibida para el proyecto MSCA-IF CAPSALIPHARM –Grant Agreement 748314

REFERENCIAS
[1] Han L *et al. Appl Environ Microbiol.* **2016**, *15; 82*(2), 450–458.
[2] CAPSALIPHARM. MSCA-IF - Cold Atmospheric Plasma (CAP) sterilization of powdered products.**2018**.Project ID:748314.Available at: https://cordis.europa.eu/project/rcn/208637_fr.html
[3] Zhang et al. *Curr Opin Biotechnol* **2017**, *46,* 74-80
[4] Sanz-Puig et al. Inn Food Sci Emerg Technol, *In Press*

ESTUDIO *IN VIVO* CON *Caenorhabditis elegans* PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE *Brassica oleracea* var. *botrytis* FRENTE A *Salmonella* Typhimurium

García-Carrión G., Ibáñez-Peinado D., Martínez A., Rodrigo D.
Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Carrer Catedràtic Agustín Escardino Benlloch 7, 46980 Paterna (Valencia), España.
dibanez@iata.csic.es

El control de la carga microbiana previa al sacrificio en animales para consumo humano puede ser una medida preventiva para evitar un exceso de contaminación por microorganismos zoonóticos a lo largo de la cadena alimentaria. Los antibióticos usados en veterinaria como método preventivo y terapéutico y como promotores del crecimiento han dado lugar a la aparición de resistencias microbianas que se propagan desde animales a humanos o al contrario, vía directa o indirecta [1,2].

Salmonella Typhimurium es un patógeno alimentario zoonótico. Fue el segundo serovar más infectivo en 2016 en UE, responsable de 94,530 casos de infecciones humanes notificadas en todos los países miembros. En animales, el porcentaje más alto fue en ganado vacuno (40%), y en alimentos se detectó principalmente en carne de ganado vacuno, cerdo y aves de corral, siendo mayoritaria en carne porcina (30%) en 2016 [3]. En junio 2017, la Comisión Europea adoptó un plan de acción frente resistencias microbianas incluyendo el desarrollo de nuevos antimicrobianos y productos alternativos para humanos y animales. En este contexto surgen alternativas relacionadas con el uso de antimicrobianos naturales como aditivos en piensos animales para reducir la carga microbiana durante el sacrificio del animal y su presencia en las distintas etapas de la cadena de producción de alimentos de origen animal [4]. Este estudio se centró en el potencial antimicrobiano de la parte no comestible de la coliflor (45-60% del peso total de la hortaliza), concretamente las hojas, las cuales poseen compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, pudiendo resultar interesante como potencial aditivo en alimentación animal y a la vez, contribuir tanto a una agricultura sostenible, como económicamente, a la optimización de gestión de residuos [5,6].

Objetivo

El objetivo del estudio fue caracterizar la evolución de la infección por *Salmonella* Typhimurium en *Caenorhabditis elegans* después de su exposición a infusión de extracto de coliflor al 3% (*Brassica oleracea* var. botrytis) durante 24h, 48h y 96h.

Material y Métodos

Los grupos de tratamiento del estudio fueron: *C. elegans* infectados con *S. Typhimurium* (5h) y alimentados con *E. coli* OP50 en medio NGM (grupo control), o bien infectados con *S.* Typhimurium (5h) y alimentados con *E. coli* OP50 en medio NGM con infusión de coliflor al 3%. El estudio se llevó a cabo en nematodos adultos jóvenes sincronizados y desarrollados a 20 ºC en medio NGM (Nematode Growth Media) con césped de *E.coli* OP50. La infección de *C.elegans* consistió en transferir adultos jóvenes sincronizados (1 nematodo/placa) desde medio NGM con césped de *E.coli* OP50 a una placa de medio NGM con césped de *S.* Typhimurium. Tras la exposición a S. *Typhimurium* durante 5 horas a 20 ºC, una parte de los nematodos fueron extraídos para lisarse, y el lisado se sembró por dilución e incubó en medio EMB 48h a 37ºC para recuento inicial de colonias presuntivas de *S.* Typhimurium (UFC) en el intestino del nematodo en esa población (t_0). Los

restantes *C.elegans* infectados se transfirieron individualmente a placas de NGM con o sin adición de infusión de coliflor y césped de *E. coli* OP50 durante 24h, 48h o 96h (t_1). Transcurridas 24h, 48h o 96h, se procedió a la lisis, siembra, incubación y recuento de UFC de *Salmonella* procedente de los nematodos del grupo control o del tratamiento con infusión de coliflor (t_1). *S.* Typhimurium se obtuvo de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 443)

Análisis Estadístico

El análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados obtenidos se realizó con Statgraphics® Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., EE.UU.) y Microsoft® Excel 2013 respectivamente.

Resultados y Discusión

En la figura 1 se puede apreciar la comparación entre la evolución de la infección por *Salmonella* en el intestino del nematodo alimentado con y sin coliflor. La supervivencia del patógeno es significativamente diferente entre ambos grupos de estudio a las 24h, 48h y 96h post-infección (p-valor ≤0.05).

La figura 1. muestra un aumento de la supervivencia de *Salmonella* en el interior de C. *elegans* infectado a las 24h, independientemente de la exposición o no al extracto de coliflor, siendo más de medio ciclo logarítmico inferior en la población de nematodos alimentados en presencia de extracto de coliflor (p-valor ≤0.05) lo que podría significar un cierto control del extracto sobre el microorganismo. A las 48h, la supervivencia de *Salmonella* se reduce casi dos ciclos logarítmicos en los nematodos alimentados con extracto de coliflor respecto del grupo control. Esto podría significar que algún/os componente/s de la infusión de coliflor podrían ayudar al nematodo a sobreponerse a la infección y así seguir con su ciclo de vida normal ó que el propio extracto estuviera matando a la *Salmonella* en el intestino del animal. No existen diferencias estadísticamente significativas entre la supervivencia de *Salmonella* a las 48h y 96h dentro del mismo grupo de estudio (p-valor >0.05).

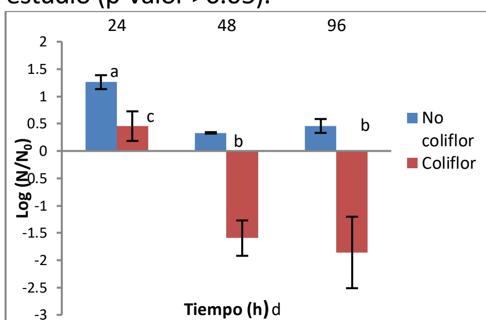


Figura 1. Probabilidad de supervivencia de Salmonella (Log (N/N_0)) en grupo control (no coliflor) y grupo de tratamiento con infusión de extracto de coliflor (coliflor). Las letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p-valor ≤ 0.05) con un IC del 95%.

Conclusión

La presencia de extracto de coliflor en el medio de alimentación de *C. elegans* parece controlar la infección por *S.* Typhimurium en el intestino del nematodo e incluso reduce la concentración de dicho microorganismo. Estos resultados abren la puerta a la incorporación de éstos extractos vegetales como aditivo en la formulación de las mezclas para el desarrollo de piensos de animales de granja. No obstante, sería necesario llevar a cabo estudios con grupos de animales controlados y observar el comportamiento en granja.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda financiera a los proyectos AGL2013-48993-C2-2-R y AGL2017-86840-C2-2-R concedidos por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad español.

REFERENCIAS

[1] Berendonk y col. *Nat Rev Microbiol*, **2015**, *13*, 310-7.
[2] Diarra y Malouin. *Front Microbiol*, **2014**, *5*, 282.
[3] EFSA. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5077. Acceso: 27 Mayo 2018.
[4] European Commission. AMR: A major European and Global challenge. https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_action_plan_2017_en.pdf. Acceso: 27 Mayo 2018.
[5] Sharmilan, Jaganathan. *Int J Recent Sci Res*, **2016**, *7*, 10459–63.
[6] Sanz-Puig ycol. *Foodb. Pathog*, **2015**, *12*:39–46.

PULSED ELECTRIC FIELD PERMEABILIZATION AND EXTRACTION OF PHYCOERYTHRIN FROM *PORPHYRIDIUM CRUENTUM*

Martínez J.M., Álvarez I., Raso J.
University of Zaragoza/Facultad de Veterinaria/Departamento Producción Animal y Ciencia de los Alimentos/Tecnología de los Alimentos. Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza (Spain)
jraso@unizar.es

B-phycoerythrin (BPE) is a water-soluble, red-coloured phycobiliprotein present in marine microalgae *Phorphyiridium cruentum.* This pigment can be used as a colorant in the food, cosmetic and pharmaceutical industries, but also as a fluorescent biomarker in immunology. Since BPE is assembled on the thylakoid membranes of chloroplast, cell disruption methods are required to obtain this pigment. However, these microalgae have a thick cell wall composed of sulfated polysaccharides that hinder cell destruction and the subsequent extraction processes. Traditional cell-disrupting methods are characterized by lack of specificity, which thereby leads to the release of cell debris and the necessity of downstream purification. Increasing general interest in the use of microalgae to obtain valuable products necessitates the elaboration of cost-effective disruption methods to overcome the problems associated with traditional pre-treatments methods. Pulsed electric fields (PEF) increase cell membrane permeability (electroporation), via the application of high-intensity electric field pulses of short duration (µs-ms). This study aims to evaluate PEF technology to improve BPE extraction from fresh *P. cruentum.*

The loss of the selective membrane permeability of *P. cruentum* was studied with the entry of fluorescent die Propidium iodide which is unable to cross through intact cytoplasmic membrane. Figure 1 shows that PI permeabilization was enhanced by increasing electric field strength and treatment time. For example, the increment of electric field strength from 2 to 10 kV/cm for 150 µs augmented the percentage of permeabilized cells from 27 to 98 %.

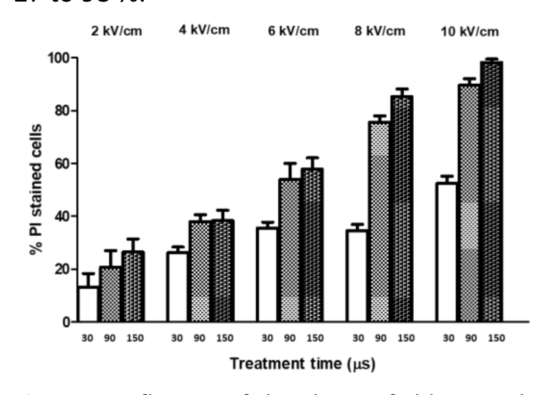


Figure 1: Influence of the electric field strength and treatment time on the PI permeabilization of *P. cruentum* cells treated by PEF.

The effect of treatment time (75 µs and 150 µs) at two electric field strengths (4 and 8 kV/cm) and of electric field strength (2, 4, 6, 8 and 10 kV/cm) at 150 µs on the extraction of BPE in McIlvaine buffer (pH 7) from *P. cruentum* is illustrated in Figure 2. BPE was scarcely detected in the extraction medium containing untreated cells of *P. cruentum* after the longest extraction time assayed in this investigation (48 hours). However, BPE was progressively released from PEF-treated cells to the extraction medium. Similarly to the increment in PI uptake, both the release rate and the maximum extraction yield of BPE depended on electric field strength and treatment time. The maximum BPE extraction yield within the shortest extraction time (24 h), which was around 30 mg BPE/g d.w., was achieved after treating *P. cruentum* cells at 8 and 10 kV/cm for 150 µs.

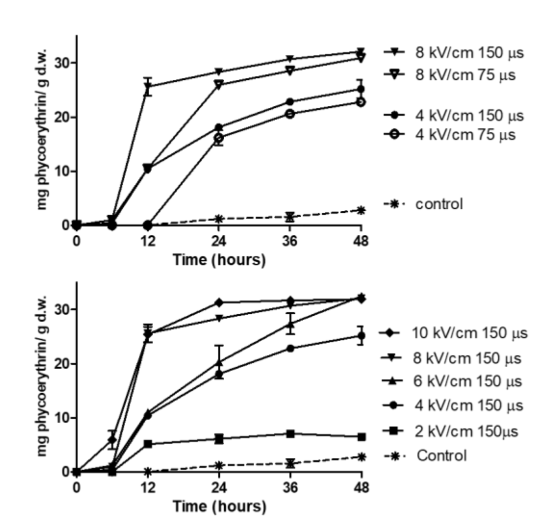


Figure 2: Extraction curves in pH 7 McIlvaine buffer of BPE from *P. cruentum.*

After those treatments, the supernatant of PEF-treated cells turned strong pink, and the remaining pellets were colorless, thereby indicating that practically 100 % of the cells' BPE content had been extracted. This extraction yield was comparable to that obtained after completely destroying the cells by bead-beating (32 mg/g d.w.), but the purity of the extract obtained (0.28±0.03), was much worse than that obtained after PEF (0.94±0.01). However, even after the application of the most intense PEF-treatments that caused permeabilization of almost 100 % of the *P. cruentum* population or after bead-beating, BPE was not released immediately after the treatment, on the contrary a lag time of at least 6 hours was observed.

PEF treatments could accelerate the autolysis process which consists in the hydrolysis of intracellular biopolymers by their own enzymes after cell death [1]. *P. cruentum* autolysis triggered by PEF could be the main cause involved in those treatments' effectivity in BPE extraction after a prolonged time. The hydrolytic enzymes could help to disassemble the associations between BPE and other structures of the cell; in this way, the water-BPE complex could diffuse across the cell membrane, driven by a concentration gradient. Recently, the autolysis of microalgae by certain lytic enzymes involved in cell division and programmed cell death such as endopeptidase has been proposed as a low cost alternative to enzymatic or physical disruption methods in order to facilitate the release of intracellular compounds [2]. However, the self-degradation of the cellular constituents by their own enzymes is a slow process that occurs after cell death. Therefore, it would be highly recommendable to accelerate this process by means of PEF treatments in order to reduce the downstream operation duration and avoid degradation of the target products.

The cell destruction stage represents one of the most critical steps which have an impact on costs and extraction yields for obtaining bio-products from microalgae. PEF could serve as an effective and cost competitive technique to obtain that objective. In this investigation it has been demonstrated that low intensity PEF treatment of *P. cruentum* fresh biomass, followed by 24 hours of incubation, permits an extraction of the totality of BPE contained in the cells, with a purity greater than that obtained via mechanical cell disruption methods. An improved understanding of the kinetics and the mechanism of the enzymes participating in microalgae autolysis, and of the autolysis trigger by PEF, will allow for the development of this process at an industrial scale in order to extract high value products from microalgae biomass.

REFERENCES

[1] J.M. Martínez, C. Delso, D. Aguilar, G. Cebrián, I. Álvarez, J. Raso. *Food Microbiol*. **2017**.

[2] M. Demuez, A. Mahdy, E. Tomás-Pejó, C. González-Fernández, M. Ballesteros. *Biotechnol. Bioeng.*, **2015**, *112* (10), 1955-1966.

INACTIVACIÓN POR PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO VOLTAJE EN FLUJO CONTINUO DE S*accharomyces cerevisiae* EN VINO

Maza M.A.[1,2], Sánchez M.L.[1], Raso J.[2], Álvarez I.[2]
1 Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias, Almirante Brown 500 Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentina.
2 Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Instituto Agroalimentario de Aragón– IA2 - (Universidad de Zaragoza-CITA), Zaragoza, España.
nacho.alvarez@unizar.es

Después de la fermentación alcohólica, el vino se estabiliza, se conserva y antes de colocarlo en botella se filtra para eliminar cualquier célula microbiana. El filtrado del vino es una técnica que se utiliza desde hace años. Actualmente existen tecnologías de filtrado que proporcionan una leve disminución de la calidad, no existiendo ninguna técnica de filtrado capaz de evitar modificaciones en la calidad del vino. Por otro lado se utiliza sulfitos (durante la conservación del vino) para impedir que microorganismos modifiquen el vino antes de su consumo. *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra presente en casi todos los vinos debido a su uso durante el proceso de elaboración. En vino seco, no genera mayores problemas, pero sí en aquellos vinos que se comercializan con distintas concentraciones de azúcar residual. En estos vinos, el dióxido de azufre es utilizado a concentraciones mayores para evitar el desarrollo microbiano. Distintos organismos internaciones (OMS, FAO, OIV) han establecido límites máximos para los vinos y han promovido una reducción de su concentración en los productos alimenticios, especialmente en los vinos. Por ello, son necesarias alternativas que permitan eliminarlos sin afectar a su calidad. Se ha demostrado la eficacia de los tratamientos por Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) para la inactivación microbiana [1]; sin embargo, los tratamientos utilizados son demasiados intensos para su uso industrial. El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de PEAV a temperaturas moderadas (<45ºC) como estrategia para reducir la intensidad de los tratamientos PEAV requeridos para la inactivación microbiana en el vino de *S. cerevisiae*.

Para ello, se evaluó el efecto de los PEAV (campo eléctrico 15, 25 y 25 kV/cm) con una cámara de electrodos paralelos, tiempo de tratamiento (15-200 µs) y energía específica (10-100 kJ/kg) aplicados en flujo continuo (12 mL/min) en vino tino (1,54 ± 0,2 mS/cm) a distintas temperaturas (20, 25, 30 y 35ºC), utilizando un generador de pulsos de 10 kV y 200A (EPULSUS-PM1-10).

La Figura 1 muestra los ciclos logarítmicos de inactivación de *S. cerevisiae* conseguidos tras la aplicación de PEAV de 20 kV/cm a distintas energías y temperaturas iniciales del vino. Y la Figura 2 la temperatura final alcanzada en el vino tras la aplicación de los mismos tratamientos que los de la Figura 1. Como se observa en la Figura 1, la inactivación incrementó con la energía y temperatura de tratamiento, siendo más rápida la muerte con bajos niveles energéticos, reduciéndose esta al aumentar la energía aplicada.

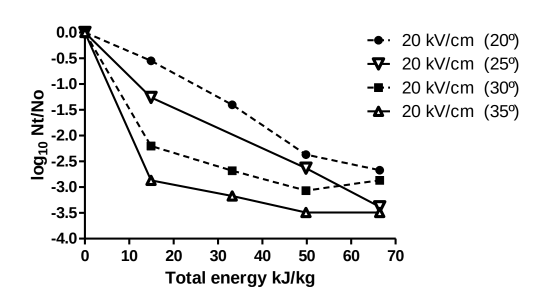


Figura 1: Curvas de supervivencia de *S. cerevisiae* tratadas por PEAV (20 kV/cm) a diferentes temperaturas iniciales del vino.

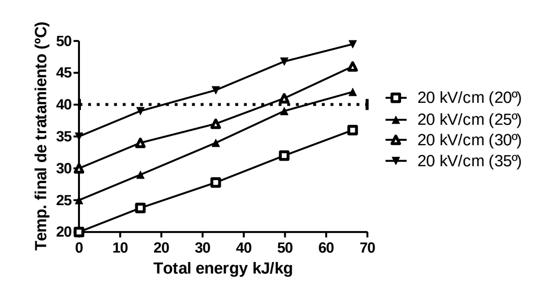


Figura 2: Temperaturas finales del vino tinto tras la aplicación de tratamientos PEAV (20kV/cm). Tiempo tratamiento: 0,5 segundos.

La temperatura inicial del vino influyó notablemente en la letalidad: un tratamiento de 16 kJ/kg (25µs) a 20 kV/cm inactivó 0,5 1,2 2,2 y 2,8 Log_{10} cuando la temperatura inicial del vino fue de 20, 25, 30 y 35ºC, respectivamente (Figura 1), y la temperatura final fue de 24, 29, 34 y 39ºC respectivamente (Figura 2). Como se observa, el incremento de temperatura para una energía de 16 kJ/cm fue calculado en 4ºC para un tiempo de residencia en el interior de la cámara de 0,39 segundos

A medida que se aumenta la energía aplicada (resultados similares cuando se representa el tiempo de tratamiento), la inactivación de *S. cerevisiae* fue mayor para las 4 temperaturas analizadas. Sin embargo, los incrementos de letalidad entre las distintas temperaturas fue cada vez menor a media que incrementaba la energía o el tiempo de tratamiento. Así, la diferencia de letalidad a 16 kJ/kg fue de 2,3 Log_{10} cuando la temperatura inicial del vino variaba desde los 20ºC hasta los 35ºC, mientras que para un tratamiento de 50 kJ/kg (75 µs) resultó de 1,19 Log_{10}.

La máxima inactivación registrada fue de 3,5 Log_{10} según se puede ver en la Figura 1 para una energía aplicada de 50 kJ/Kg y una temperatura inicial del vino en 35ºC; sin embargo la temperatura final de tratamiento en ese caso fue de 46,8ºC (Figura 2). En este caso, la inactivación observada también estuvo influenciada por el calor aportado, debido a la temperatura final alcanzada. La mayor inactivación para un campo eléctrico de 20 kV/cm y con temperaturas finales por debajo de 40ºC fue de 2,6 Log_{10} con 50 kJ/kg (39ºC). La inactivación alcanzada fue mayor que la observada por otros autores [2, 3].

Los resultados demuestran que los PEAV aplicados a temperaturas moderadas (inferiores a 40ºC como temperatura final) son una estrategia adecuada para su implementación de la tecnología PEAV a nivel industrial. Los tiempos de tratamientos son inferiores a 0,5 segundos y en este caso habrá que evaluar el impacto de los tratamientos en la calidad del vino.

AGRADECIMIENTOS

M.M. reconoce con gratitud el apoyo financiero para sus estudios de Doctorado a la Universidad Nacional de Cuyo, Argentina. Y al Fondo Europeo de Desarrollo Regional, y al Departamento de Investigación en Innovación y al Gobierno de la Universidad del Gobierno de Aragón y el Fondo Social Europeo (FSE).

REFERENCIAS

[1] Puértolas, E., López, N., Condón, S., Raso, J., & Álvarez, I. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *130*(1), 49-55.

[2] González-Arenzana, L., Portu, J., López, R., López, N., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., & López-Alfaro, I. *Innov. Food Sci. Emerg Technol.* **2015**, *29*, 187-192.

[3] Pataro, G., Ferrentino, G., Ricciardi, C., Ferrari, G. *J. Supercrit. Fluids*, **2010**, *54*(1), 120-128.

EFECTO DE LA TURBIDEZ EN LA DESINFECCIÓN DE *LISTERIA INNOCUA* EN TOMATE MEDIANTE LA TECNOLOGÍA UV-C ASISTIDA POR AGUA

Viñas I.[1], Colás-Medà P.[2], Anguera M.[2], Abadias M.[2]
1 Universitat de Lleida/Departamento de Tecnología de Alimentos/ XaRTA-Postharvest/ Centro Agrotecnio/ Rovira Roure 191, 25198 Lleida
2 Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries/ XaRTA-Postharvest/ Edifici Fruitcentre, Parc Científic i Tecnològic Agroalimentari de Lleida, Parc de Gardeny, 25003, Lleida.
ivinas@tecal.udl.cat

El hipoclorito sódico es actualmente el método de desinfección más utilizado en las industrias de transformación de frutas y hortalizas. Sin embargo, su uso está siendo cuestionado por la posible formación de compuestos derivados que son potencialmente cancerígenos [1]. El uso de la luz UV-C asistida por agua está siendo investigada como alternativa [2]. Los principales inconvenientes de su uso son el bajo poder de penetración y, en el caso de los equipos en los que se utiliza la luz UV-C asistida por agua, la turbidez de la misma. En este estudio se pretende evaluar el efecto de la turbidez en la desinfección de *Listeria innocua* en tomates y en el agua de lavado.

El trabajo se realizó con tomates de la variedad 'pera' en estado de madurez comercial (97-147 g/unidad). Los tomates se lavaron, secaron y se marcaron con un círculo (2,2 cm diámetro). El día anterior al ensayo, se inocularon de forma superficial (50 µl, repartidos en varias gotas) dentro del círculo, con una suspensión concentrada de *Listeria innocua* CECT-910 (≈10^9 ufc/ml). La población inicial del patógeno sobre los tomates se determinó por triplicado (3 tomates) antes y después de los distintos tratamientos. Se tomó la piel del circulo marcado, con la ayuda de un sacabocados de 2,2 cm de diámetro, y se homogenizó durante 2 min con 20 ml de agua de peptona tamponada (APT) dentro de una bolsa estéril. La muestra se sembró en superficie en medio selectivo Palcam (Oxoid) y las placas se incubaron a 37°C durante 48 h. Los resultados se expresaron en ufc/cm^2 de piel.

El prototipo de equipo UV-C asistido por agua está compuesto por un tanque de agua con un sistema de recirculación, y cuatro lámparas de UV (17,2 W) dispuestas longitudinalmente en el centro (LAB-UVCGama, UV-Consulting Peschl España, Castellón). Para determinar únicamente el efecto del lavado con agua, se realizó un tratamiento control dentro del prototipo con las lámparas apagadas. También se determinó a distintos tiempos (1, 3, 5 y 10 min) el efecto de la desinfección mediante el UV-C en agua limpia (0,47 NTU) y agua con dos niveles de suciedad distintos: baja (3% de tomate triturado, 173 NTU) y alta (10% de tomate triturado, 683 NTU).

El tanque del equipo UV-C se llenó con 12 L de agua de red fría (5-8 °C). Paralelamente, junto a los recuentos en la piel de los tomates tratados se realizaron recuentos y detección de *L. innocua* en las muestras de agua tomadas en cada tiempo ensayado para evaluar su efecto en el agua, importante para prevenir contaminaciones cruzadas.
Los tomates inoculados presentaron una población inicial de *L. innocua* de 6,9±0,1 unidades logarítmicas (log) ufc/cm^2 (Fig. 1). No se observaron diferencias significativas en la piel del tomate entre el tratamiento de agua y el de agua limpia con UV-C, observándose reducciones de 4,7±0,8 y

5,8±0,0 log ufc/cm^2 a los 5 min, respectivamente. Sin embargo, se observaron diferencias entre las muestras de agua de estos tratamientos. En el agua de lavado tras el tratamiento control la población de *L. innocua* fue de 1,7, 1,9 y 2,1 log ufc/ml, tras 1, 3 y 5 min del lavado; mientras que las muestras de agua del tratamiento UV-C en agua limpia presentaron ausencia de *L. innocua* en todos los tiempos.

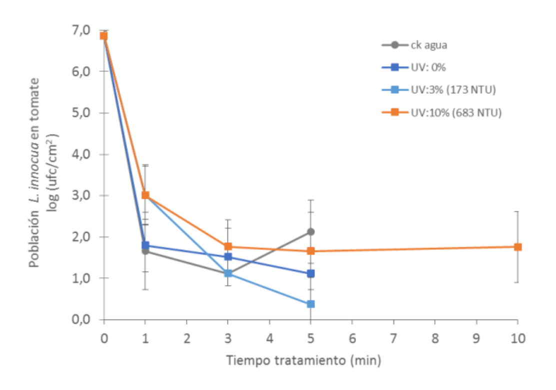


Figura 1: población de *L. innocua* en tomates después del tratamiento en el prototipo UV-C asistido por agua.

En los tratamientos UV-C en los que el agua presentó un nivel de suciedad bajo (173 NTU), se observaron diferencias significativas en la población de *L. innocua* en la piel del tomate entre 1 min de exposición al UV-C (3,9±0,7 log reducción) y los 3 y 5 min, obteniendo una reducción máxima de 6,5±0,6 log ufc/cm^2 a los 5 min. También se observó que la población de *L. innocua* en el agua de lavado con baja suciedad se reducía al incrementar el tiempo de exposición al UV, de 1,9 log ufc/ml a 1 min a 0,4 log ufc/ml a los 5 min. Cuando el nivel de suciedad del agua fue alto (683 NTU) no se observaron diferencias entre los distintos tiempos de exposición al UV-C en tomate, presentando una reducción media de 4,8±0,9 log ufc/cm^2. La efectividad de la radiación UV en el agua con alto nivel de suciedad se redujo, presentando una población de *L. innocua* de 2,5 log ufc/ml después de 1 min y de 0,7 log ufc/ml transcurridos 10 min del tratamiento UV.

El tratamiento con el prototipo UV-C ensayado presentó una reducción media de *L. innocua* de 5,2±0,9 log ufc/cm^2 en tomate. En producto, no se observaron diferencias significativas con el uso de la luz UV-C. Las reducciones en producto observadas en el prototipo UV-C ensayado, son mucho mayores que las obtenidas a nivel general con el tratamiento con hipoclorito (1-2 log, [3]). Cabe destacar la importante reducción que obtuvo este sistema en el agua de lavado, llegando a recuentos de *L. innocua* por debajo del límite de detección. También se observó que cuando el agua presentó un nivel de suciedad inferior a 173 NTU, un mayor tiempo de exposición consiguió mayor destrucción del patógeno. Para que el agua de tratamiento con un alto nivel de suciedad (683 NTU) presentara una población de *L. innocua* similar a la del agua con un nivel de suciedad bajo, fue necesario doblar el tiempo de exposición a la luz UV-C, pasando de 5 a 10 min. Estos resultados abalan la importancia de incorporar un filtrado del agua en el momento de la recirculación, reduciendo de este modo el nivel de suciedad e incrementando la efectividad de la radiación UV-C asistida por agua.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al proyecto TECALZIM ((RTC-2016-5498-2) por su apoyo económico y al Programa CERCA (Generalitat de Catalunya).

REFERENCIAS

[1] Ölmez, H. and U. Kretzschmar, *LWT-Food Sci. Technol.*, **2009**, *42(3)*,686-693.
[2] Collazo C, Lafarga T, Aguilo-Aguayo I, Marín-Saez J, Abadias M, Viñas I., Food Control, **2018**, *93*, 92-100.
[3] Beuchat, L.R., WHO/FSF/FOS, **1998**, *98.2*, 1-52.



SESIÓN 5A. MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO

DETECCIÓN DE *ARCOBACTER* EN ALIMENTOS DE ORIGEN MARINO Y SUS POSIBLES IMPLICACIONES PARA LA SALUD PÚBLICA

Figueras M.J.[1,2], Salas-Massó N.[1,3], Pérez-Cataluña A.[2], Andree K.B.[3], Furones M.D.[3]
1 Unidad de Microbiología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili, C/Sant Llorenç 21, Reus.
2 Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Avda. de la Universitat, 1 - 2a planta, Reus.
3 IRTA- Sant Carles de la Ràpita, Crtra Poble Nou Km 5.5, Sant Carles de la Ràpita (Tarragona).
mariajose.figueras@urv.cat

El género *Arcobacter* comprende especies Gram negativas de forma curvada, de las cuales algunas, especialmente *Arcobacter butzleri*, son consideradas patógenas emergentes que pueden llegar a causar cuadros de diarrea y bacteremia en humanos [1]. Se considera que la principal ruta de transmisión de estos patógenos es por consumo de agua y alimentos contaminados. Actualmente, el género está compuesto por 27 especies de las cuales 9 (33.3%) han sido originalmente aisladas de moluscos bivalvos por lo que este tipo de alimento supone un reservorio de *Arcobacter* que puede representar un riesgo para el consumidor [1]. Por ello en los últimos años el número de estudios investigando la prevalencia de *Arcobacter* en alimentos de origen marino ha incrementado notablemente. El porcentaje de prevalencia de *Arcobacter* en este tipo de alimentos va desde un 17.1% hasta un 73.3% [2].

Entre los distintos tipos de alimentos de origen marino, el marisco es el que presenta una mayor positividad en cuanto a la detección de *Arcobacter*, siendo los mejillones los bivalvos más estudiados. Debido a que estos alimentos son normalmente consumido crudos o poco cocinados, en la Unión Europea se han establecido unas medidas que regulan las áreas de recolección de bivalvos. Estas medidas están basadas en los niveles de *Escherichia coli* presentes en los moluscos que se determinan como parte de un programa de monitoreo continuo y que clasifica las zonas de cultivo en cuatro categorías (A-D). Así, en la categoría A, el marisco no requiere depuración y puede ser consumido directamente ya que el 80% de las muestras no sobrepasa 230 Numero Más Probable (NMP) de *E. coli* /100g y el 20% restante no excede 700 NMP/100g. Las categorías B, C y D el marico requieren depuración hasta alcanzar los valores de la categoría A antes de ser consumidos.

Dos estudios recientes uno llevado a cabo en Italia [3] y otro en España por nuestro grupo [4] han demostrado que los niveles de *E. coli* en marisco están correlacionados con la presencia de *Arcobacter butzleri* y *Arcobacter cryaerophilus* en los mismos. Sin embargo, se ha observado que *E. coli* fallaría como indicador de *Arcobacter* durante los meses en los que la temperatura del agua está por encima de 26°C, es decir, durante los meses de verano. Estas muestras fueron negativas para la presencia de *E. coli* pero sin embargo demostraron ser positivas para *A. butzleri* [4].

Por otra parte, cuando los niveles de *E. coli* en mejillones y ostrones fueron de < 230 NMP/ 100g, los ostrones resultaron ser mucho más positivos para la presencia de *Arcobacter* que los mejillones (83 vs. 44%). Las especies más prevalentes en este tipo de muestras fueron *A. molluscorum* (más

abundante en mejillones), *A. marinus* (más abundante en ostrones) o *A. mytili*, todas ellas consideradas especies ambientales [4].

La metodología empleada para el análisis de *Arcobacter* en alimentos de origen marino, determina que especies se recuperan, así como la positividad de las muestras. En este sentido se ha demostrado que la adición de una concentración final 2.5% NaCl en el caldo Arcobacter-CAT de pre-enriquecimiento y el posterior cultivo en agar marino, aumenta en un 40% la positividad de las muestras y la diversidad de especies recuperadas en comparación con la metodología convencional que es un pre-enriquecimiento en caldo Arcobacter-CAT y posterior cultivo en agar sangre [2]. Con el método convencional se recuperaron 7 especies conocidas y 2 potenciales especies nuevas, que se encuentran en proceso de descripción. En cambio, con la nueva metodología se aislaron 11 especies conocidas, entre las cuales se encontraban *A. marinus* y *A. halophilus*, de las cuales solo se conocían las cepas tipo incluidas en su descripción original en USA y Corea, y también se aislaron hasta 7 nuevas especies [2].

La incorporación en los últimos años de un gran número de nuevas especies al género *Arcobacter*, ha puesto en evidencia que estas presentan una gran diversidad en base a la similitud del gen 16S rRNA que oscila entre 91.2-99.6%. Los valores de similitud <95% sugieren que algunas especies podrían considerarse como pertenecientes a otros géneros. El análisis del *core genome* (284 genes), así como de diferentes índices genómicos de 55 cepas incluyendo las cepas tipo han evidenciado que el género *Arcobacter*, puede dividirse en 7 nuevos géneros, para los que los nombres propuestos son *Arcobacter*, *Aliiarcobacter* gen. nov., *Pseudoarcobacter* gen. nov., *Haloarcobacter* gen. nov., *Malacobacter* gen. nov., *Poseidonibacter* gen. nov., y Candidato *'Arcomarinus'* gen. nov [5]. El género *Aliiarcobacter* comprendería las especies típicamente consideradas patógenas humanas y de animales y que están estrechamente relacionadas con contaminación fecal (*A. cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, entre otras). Otros géneros, como *Malacobacter* gen nov. comprendería especies típicamente asociadas a moluscos (*A. halophilus*, *A. mytili, A. marinus*, *A. molluscorum* y *A. pacificus*) y de las cuales se sabe muy poco sobre su potencial patógeno para los humanos o animales. Sólo se conocen algunos datos sobre *A. molluscorum* y *A. mytili* que mostraron capacidad de adherencia, pero no de invasión a células intestinales Caco-2.

La erradicación y eliminación de las infecciones provocadas por *Arcobacter* se puede conseguir si se llevan a cabo buenas prácticas sanitarias para prevenir la contaminación del agua y de los alimentos con heces o con agua residual, que son consideradas como las principales fuentes de estas bacterias.

AGRADECIMIENTOS

Estos estudios han estado financiados por los proyectos JPIW2013-69 095-C03-03 del MINECO y AQUAVALENS (FP7/2007-2013).

REFERENCIAS

[1] L Collado, MJ Figueras, M.J. *Clin. Microbiol. Rev,* **2011,** *24*, 174–192.

[2] N Salas-Massó, KB Andree, MD Furones, MJ Figueras. *Sci Total Environ*, **2016**, *566-567*, 1355–1361.

[3] F Leoni, S Chierichetti, S Santarelli, G Talevi, L Masini, C Bartolini, E Rocchegiani, M Naceur Haouet, D Ottaviani. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *245*, 6-12.

[4] N Salas-Massó, MJ Figueras, KB Andree, MD Furones, *Sci. Total Environ.* **2018**, *624,* 1171-1179.

[5] A Pérez-Cataluña, N Salas-Massó, ABL Dieguez, S Balboa, A Lema, JL. Romalde, MJ Figueras. *Front Microbiol.* en prensa.

20 AÑOS DE ESTUDIOS SOBRE LA PREVALENCIA DE VIRUS ENTÉRICOS HUMANOS EN MOLUSCOS DE GALICIA

Romalde J.L.

Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS- Facultad de Biología. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Vida s/n, 15782, Santiago de Compostela

jesus.romalde@usc.es

La costa de Galicia (NO España) con más de 1.490 km y una topografía particular, caracterizada por la presencia de rías con una importante producción primaria, hacen que esta región sea muy favorable para el cultivo de moluscos. De hecho, Galicia es uno de los productores de mejillón más importantes del mundo, con más de 250.000 ton/año.

Debido a la proximidad a núcleos de población así como a las actividades antropogénicas en estos estuarios, y a pesar de los controles rutinarios oficiales de las áreas de cultivo de bivalvos, a veces es posible la contaminación con material de origen fecal. Aunque la legislación actual, basada en *Escherichia coli* como microorganismo indicador, se ha revelado útil para el control de contaminantes bacterianos, no ocurre lo mismo en el caso de los virus entéricos.

El objetivo de este trabajo es ofrecer una visión de la situación de diferentes áreas de cultivo en Galicia desde un punto de vista virológico. Se presenta una recopilación de los resultados obtenidos en los últimos 20 años, que incluye no solo los datos de los clásicos norovirus (NoV) y virus de la hepatitis A (HAV), sino también de agentes emergentes, incluyendo sapovirus (SaV), virus de la hepatitis E (HEV) y aichivirus (AiV). También se presentan y discuten diferencias epidemiológicas relacionadas con las características de las áreas de cultivo, la distribución genotipos virales o los vínculos epidemiológicos entre las cepas ambientales y clínicas.

La presentación conjunta de estos datos históricos podrá ser de utilidad en futuras decisiones de las autoridades competentes para una mejor gestión de las áreas de cultivo de bivalvos.

El primer estudio sistemático de la presencia del virus entérico en las Rías de Galicia se realizó en los años 90 del siglo pasado [1]. Se analizaron un total de 164 muestras de 3 especies de moluscos, recolectados en diferentes áreas de Galicia (Figura 1), para determinar la presencia del virus de la hepatitis A y Enterovirus (EV).

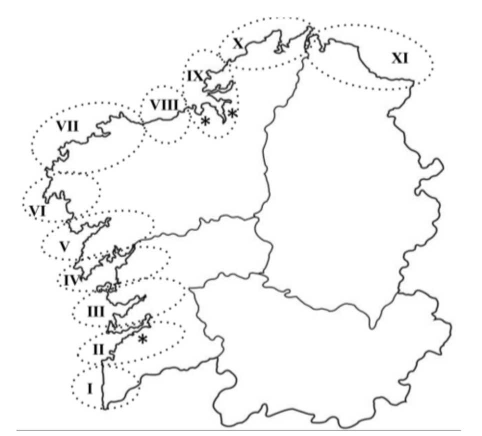


Figura 1: Zonas de producción de moluscos analizadas en el primer estudio.

Se detectó HAV en 27,4% y EV en 43,9% de las muestras que fueron analizadas. La detección simultánea de ambos tipos virales ocurrió en el 14,1% de las muestras. Es interesante señalar que no se observó una relación significativa entre la contaminación viral y bacteriana, o entre la presencia de HAV y EV.

Entre marzo de 2004 hasta diciembre de 2006 y entre enero de 2011 y junio de 2012 se realizaron nuevos estudios en esta misma zona [2-6]. En el primero de estos períodos, NoV GII fue el virus más

prevalente, detectándose en el 53,7% de las muestras analizadas. Se observó además un incremento en la prevalencia de HAV con un 43,1% de muestras positivas. NoV GI, AsV, EV y RV se encontraron con prevalencias menores.

En el segundo período, se observó un importante cambio en las prevalencias, siendo Nov GI fue el virus más prevalente (34,6%) seguido de NoV GII (25,6%), SaV (21,8%), HAV (7,7%) y AiV (5,1%). Así, la prevalencia del HAV disminuyó drásticamente del 43,1% al 7,7%, disminución que podría estar relacionada con la implementación en 2011 de un programa de saneamiento en la Ría de Vigo. Por otro lado, se observó un aumento en la prevalencia (de 7,3 a 34,6%) de NoV GI, considerada más ambiental, y una disminución del 50% en la de NoV GII. En muestras clínicas procedentes de la misma zona geográfica se detectaron genotipos comunes a los detectados en moluscos.

En los últimos años se realizaron también muestreos en dos rías del norte de Galicia, la Ría del Burgo en A Coruña y la Ría de Ares-Betanzos. Las prevalencias virales observadas en la Ría de Ares-Betanzos fueron en general similares a las encontradas en la Ría de Vigo, a pesar de las diferencias en las características de ambos estuarios. Por el contrario, la Ría do Burgo, con una clara influencia urbana, mostró ser la mayor contaminación por virus detectándo prevalencias del 49,4% para Norovirus, 37,5% para SaV, 18,5% para HAV, 14,8% para HEV y 3,7% para AiV [7-9].

La falta de un diagnóstico etiológico riguroso y de investigaciones epidemiológicas en muchos brotes gastrointestinales, así como de análisis virológicos rutinarios en moluscos bivalvos, limitan claramente nuestro conocimiento sobre el origen de contaminación en los brotes víricos transmitidos por alimentos, especialmente en casos esporádicos. Lo que parece evidente es que la presencia de virus entéricos en moluscos refleja la distribución de esos virus en la población.

AGRADECIMIENTOS

Los trabajos del grupo de la Universidade de Santiago de Compostela incluidos en esta revisión fueron financiados en parte por la Xunta de Galicia (España), y el VI Programa Marco de la Comisión Europea

REFERENCIAS

[1] Romalde, J.L., Area, E., Sánchez, G., Ribao, C., Torrado, I., Abad, X., Pintó, R.M., Barja, J.L., Bosch, A. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *74*, 119-130.

[2] Manso, C.F., Polo, D., Vilariño, M.L., Romalde, J.L. *Water Sci. Technol.* **2010,** *61*, 15-24.

[3] Vilariño, M. L., Le Guyader, F. S., Polo, D., Schaeffer, J., Kro¨l, J., & Romalde, J. L. *Int. Microbiol.* **2009**, *12*, 145–151.

[4] Polo, D., Varela, M.F., Romalde, J.L. *Int J. Food Microbiol.* **2015**, *16*, 43-50.

[5] Rivadulla, E., Varela, M.F., Romalde, J.L. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *122*, 516-521.

[6] Varela, M.F., Polo, D. and Romalde, J.L. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016a,** *82*, 1167-1172.

[7] Manso, C.F., Romalde J.L. *Food Environ. Virol.* **2013**, *5*,110-8.

[8] Mesquita, J.R., Oliveira, R.M., Coelho, C., Vieira-Pinto, M., Nascimento, M.S. *Transbound Emerg. Dis.* **2014***,* *63*, 574–578.

[9] Varela, M.F., Hooper, A.S., Rivadulla, E., Romalde, J.L. *Food Environ. Virol.* **2016b**. *8*,187-193.

MICROBIOTA DE OCHO ESPECIES DE ALGAS COMESTIBLES DESHIDRATADAS

Del Olmo A., Picón A., Núñez M.
INIA, Departamento de Tecnología de Alimentos, Carretera de La Coruña Km 7, 28040 Madrid
apicon@inia.es

Se ha estudiado la microbiota de 8 especies de algas comestibles deshidratadas. Además de los análisis en 8 medios de cultivo, se seleccionaron e identificaron 225 colonias representativas.
La población microbiana más elevada se encontró en *U. pinnatífida*, con niveles medios de 5,0 Log UFC / g en agar marino y 2,4 Log UFC / g en VRBA.
Los 225 aislados identificados pertenecían a 11 familias, 27 géneros y 56 especies. La família *Bacillaceae* fue la que contó con el mayor número de aislados (111) seguida de las familias *Enterobacteriaceae* (60) y *Bacillales* Familia XII *Incertae Sedis* (20). Las especies bacterianas más frecuentes fueron *Bacillus megaterium*, *B. licheniformis*, *Pantoea* sp. y *Pantoea* termorresistente sp. Cuatro especies de *Bacillus* aisladas de algas deshidratadas (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis*) están consideradas como patógenos alimentarios, y nueve de las especies no-Bacillales han sido descritas como patógenos oportunistas.

Introducción

Aunque las algas contienen ingredientes funcionales y compuestos bioactivos (3), su contribución a la dieta occidental es bastante reducida (4). En la superficie de las algas reside una microbiota muy diversa que participa en funciones fisiológicas del alga y en la defensa frente a microorganismos patógenos (1).
La deshidratación tiene un efecto sobre los compuestos funcionales de las algas y sus propiedades (3), y previsiblemente tendrá un efecto selectivo sobre la microbiota, con una inhibición del crecimiento ocasionada por la pérdida de humedad, y un efecto letal sobre los microorganismos menos termorresistentes. Además, durante el almacenamiento, los microorganismos no formadores de esporas experimentarán una progresiva pérdida de viabilidad (2).
No existe información sobre la microbiota de algas deshidratadas, que generalmente son consumidas tras un periodo de rehidratación a temperatura ambiente. La presencia de microorganismos patógenos podría suponer un riesgo para la salud.

Objetivo

Estudiar las poblaciones bacterianas cultivables en ocho especies de algas comestibles deshidratadas, con especial interés en su seguridad microbiológica.

Materiales y Métodos

Algas. *Chondrus crispus* (Musgo de Irlanda), *Himanthalia elongata* (Espaguetti de mar), *Laminaria ochroleuca* (Kombu), *Palmaria palmata* (Dulse), *Porphyra umbilicalis* (Nori), *Saccharina latissima* (Kombu de azúcar), *Ulva lactuca* (Lechuga de mar) y *Undaria pinnatifida* (Wakame). Fueron recolectadas en Galicia, lavadas y deshidratadas a 46-48°C durante 24 h.

Análisis microbiológicos. 10 g de algas se homogeneizaron en 100 ml de NaCl al 2% estéril. Se determinaron: microorganismos aerobios totales (PCA a 25°C y 45°C y M17), bacterias marinas heterotróficas (Agar Marino), bacterias lácticas (MRS a pH 5,7), enterococos (KF), bacterias Gram-negativas (McConkey), coliformes (VRBA) y mohos y levaduras (CGA).

Selección y caracterización de aislados. 225 colonias fueron examinadas al microscopio, se realizaron pruebas de Gram, catalasa y oxidasa, y se amplificó y secuenció un fragmento del gen *16S rDNA*. También se realizaron pruebas bioquímicas (API 20E y API 50CH, BioMérieux España) a

los aislados cuyas secuencias obtuvieron homologías inferiores al 99% y/o que podían pertenecer a varias especies.

Resultados

Los niveles de microorganismos en los medios más significativos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Recuentos microbiológicos de ocho especies de algas comestibles deshidratadas.

Alga	Medio	Media±DS	Rango
Chondrus crispus	PCA, 25°C	3,99 ± 0,13 [bc]	3,83 - 4,18
	PCA, 45°C	2,54 ± 0,28 [abc]	2,36 - 2,85
	Agar Marino	4,21 ± 0,12 [bc]	4,05 - 4,39
	VRBA	ND	ND
Himanthalia elongata	PCA, 25°C	1,34 ± 0,52 [a]	ND - 2,53
	PCA, 45°C	1,41 ± 0,45 [a]	ND - 2,36
	Agar Marino	1,67 ± 0,74 [a]	ND - 2,78
	VRBA	ND	ND
Laminaria ochroleuca	PCA, 25°C	4,03 ± 1,49 [bc]	1,60 – 5,64
	PCA, 45°C	2,08 ± 0,88 [ab]	1,00 - 3,59
	Agar Marino	4,36 ± 1,59 [bc]	1,48 - 5,95
	VRBA	1,59 ± 0,97 [ab]	0,70 - 3,31
Palmaria palmata	PCA, 25°C	3,41 ± 1,22 [bc]	1,30 - 4,51
	PCA, 45°C	3,11 ± 0,31 [c]	2,83 - 3,47
	Agar Marino	3,71 ± 0,75 [bc]	2,26 - 4,78
	VRBA	1,36 ± 0,53 [ab]	ND - 2,27
Porphyra umbilicalis	PCA, 25°C	3,46 ± 0,72 [bc]	2,15 - 4,49
	PCA, 45°C	2,34 ± 0,24 [ab]c	1,98 - 2,76
	Agar Marino	3,56 ± 1,20 [b]	1,60 - 4,61
	VRBA	1,20 ± 0,50 [a]	ND - 2,48
Saccharina latissima	PCA, 25°C	2,57 ± 1,02 [ab]	1,00 - 3,48
	PCA, 45°C	2,48 ± 0,32 [abc]	2,04 - 2,73
	Agar Marino	3,09 ± 0,71 [ab]	1,95 - 4,20
	VRBA	ND	ND
Ulva lactuca	PCA, 25°C	2,63 ± 1,40 [ab]	1,48 - 4,54
	PCA, 45°C	2,51 ± 0,29 [bc]	2,02 - 2,98
	Agar Marino	3,15 ± 1,16 [b]	2,15 - 4,80
	VRBA	1,81 ± 1,20 [ab]	1,30 - 3,84
Undaria pinnatifida	PCA, 25°C	4,47 ± 1,88 [c]	1,78 - 7,27
	PCA, 45°C	2,18 ± 1,34 [abc]	1,00 - 4,46
	Agar Marino	4,99 ± 1,30 [c]	3,85 - 7,67
	VRBA	2,38 ± 1,63 [b]	1,00 - 4,60

Media ± DS expresadas como Log UFC / g.
[abc]Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre algas para niveles en el mismo medio.

Los 225 aislados bacterianos pertenecían a 3 phyla (148 Firmicutes/Bacilli, 74 Gammaproteobacteria y 3 Actinobacteria), 6 órdenes (147 Bacillales, 60 Enterobacteriales, 12 Pseudomonadales, 3 Micrococcales, 2 Xanthomonadales y 1 Lactobacillales), 11 familias (111 *Bacillaceae*, 60 *Enterobacteriaceae*, 20 *Bacillales* Familia XII *Incertae Sedis*, 11 *Planococcaceae*, 7 *Moraxellaceae*, 5 *Paenibacillaceae*, 5 *Pseudomonadaceae*, 2 *Micrococcaceae*, 2 *Xanthomonadaceae*, 1 *Carnobacteriaceae* y 1 *Microbacteriaceae*), 27 géneros y 56 especies.

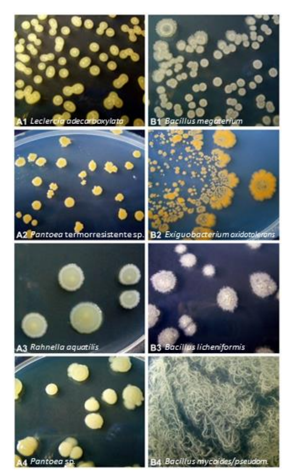


Figura 2. Colonias de las bacterias Gram-negativas (A1-A4) y Gram-positivas (B1-B4) más abundantes.

Conclusiones

A pesar de los niveles microbianos reducidos (medias inferiores a 5,0 log UFC / g), se ha encontrado una gran diversidad microbiana en las algas deshidratadas.

Los niveles de microorganismos detectados no suponen un riesgo para la salud, pero entre los aislados identificados, 4 especies de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* y *B. subtilis*) contienen cepas consideradas como patógenos alimentarios y 2 especies de *Bacillus* (*B. megaterium* y *B. mycoides*) y 9 de las especies no-Bacillales (*Enterobacter ludwigii*, *Escherichia vulneris*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pseudomonas fulva*, *P. putida*, *Rahnella aquatilis* y *Stenotrophomonas maltophilia*) han sido descritas como patógenos oportunistas.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto AGL2013-42911-R.

REFERENCIAS

[1] AH Campbell, et al. *Front. Microbiol.*, **2015**, *6*, 230.
[2] A del Olmo, et al. *Food Microbiol.*, **2018**, *70*, 224-31.
[3] S Gupta, N Abu-Ghannam, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **2011**, *12*, 600-609.
[4] JE Moore, J Xu, BC Millar, *Food Microbiol.*, **2002**, *19*, 249-257.

EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL Y CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE SEPIA COCIDA (*Sepia pharaonis*) SOMETIDA A DISTINTOS TRATAMIENTOS DE CONSERVACIÓN

González-Fandos E., Fernández-Durán I.
Universidad de La Rioja/Facultad de Ciencia y Tecnología/Departamento de Agricultura y Alimentación/ Tecnología de los Alimentos. Madre de Dios 53, 26006 Logroño, La Rioja)
elena.gonzalez@unirioja.es

Introducción

La sepia cocida (*Sepia pharaonis*) es un producto de la pesca de alta demanda a nivel de restauración. Sin embargo, el producto cocido comercializado cuenta con una vida útil muy limitada, por lo que parece oportuno adoptar estrategias que permitan alargar su vida útil, manteniendo su calidad microbiológica y características sensoriales.

Objetivo

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto del lavado con una combinación de conservantes, lauril arginato y ácido láctico, en sepia cocida, envasada posteriormente al vacío.

Material y Métodos

Para realizar los estudios se partió de sepia congelada eviscerada. Antes de iniciar el ensayo se procedió a la descongelación, lavado y adición de aditivos antioxidantes (ascorbato sódico y metabisulfito potásico) e ingredientes como almidón y proteína de leche que aportan textura y sabor, respectivamente, al producto. Posteriormente se realizó la cocción en agua y el posterior enfriado.
Antes del envasado se sometió al producto a un lavado por inmersión en lauril arginato y ácido láctico, a una concentración del 0,34% y 0,02%, respectivamente, durante 30 segundos. El lote control se sometió a lavado en agua desionizada.

A continuación de procedió al envasado al vacío y posterior almacenamiento a 4ºC. Se tomaron muestras después del lavado y a los 20, 29 y 61 días de almacenamiento. Se analizó la evolución de distintos parámetros microbiológicos, así como las características sensoriales.

Los parámetros microbiológicos analizados fueron los siguientes:

- Flora aerobia mesófila (método ISO 4833:2006 a 30 ºC, con límite de detección 10 ucf/g)
- Flora anaerobia (método ISO 4833:2006 a 30 ºC, con límite de detección 10 ucf/g)
- Bacterias acidolácticas (método ISO 15214:1998, con límite de detección de 10 ucf/g)

Resultados

En la figuras 1 a 3 se presenta la evolución de la flora aerobia mesófila, flora anaerobia y bacterias acidolácticas a lo largo del almacenamiento en sepia cocida tratada y sin tratar.

La reducción del crecimiento bacteriano es notable en el caso del tratamiento con lauril arginato y ácido láctico. A los 29 días de almacenamiento se observa que la población de flora aerobia mesófila,

anaerobios y flora acidoláctica fue 4 unidades logarítmicas menor en los lotes tratados que en los lotes control. En los lotes tratados no se detectó flora acidoláctica si bien en el lote control se alcanzaron a los 60 días poblaciones de 5 log ufc/g. La flora aerobia mesófila alcanzó poblaciones superiores a 7 log ufc/g en los lotes control a los 60 días de almacenamiento, mientras que en los lote tratados las poblaciones alcanzadas fueron inferiores a 5 log ufc/g.

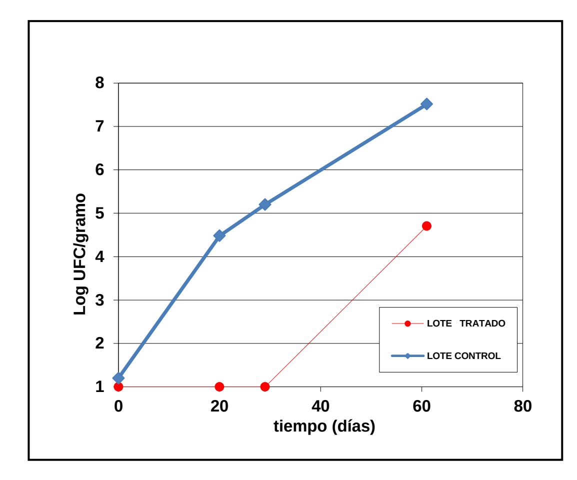


Figura 1. Evolución de la flora aerobia mesófila en sepia cocida troceada con y sin tratamiento almacenada a 4ºC

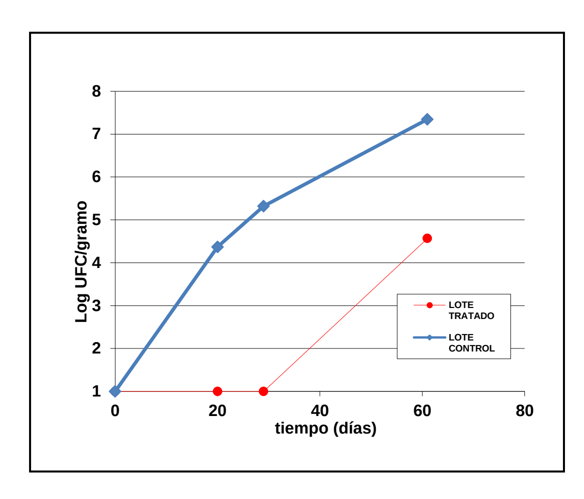


Figura 2. Evolución de la flora anaerobia en sepia cocida troceada con y sin tratamiento almacenada a 4ºC.

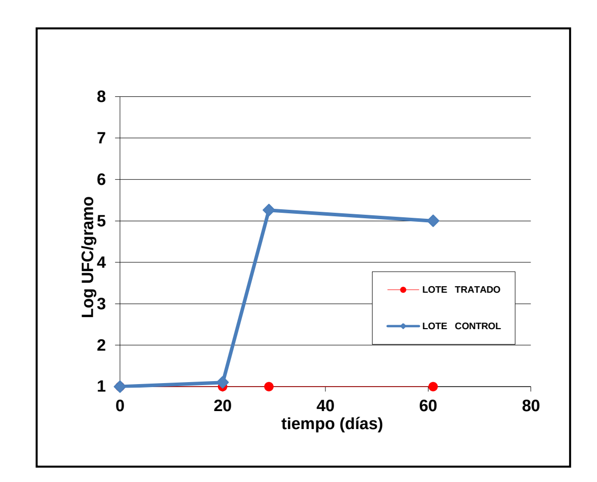


Figura 3. Evolución de bacterias acidolácticas en sepia cocida troceada con y sin tratamiento almacenada a 4ºC**.**

Las características sensoriales de la sepia no se vieron afectades negativamente. El sabor, olor, color y textura fueron aceptables, tanto en la muestra control como en la muestra tratada con lauril arginato y ácido láctico.

El presente trabajo pone de manifiesto la eficacia del lavado de sepia cocida con lauril arginato y ácido láctico en el control del crecimiento microbiano sin afectar negativamente a la calidad sensorial.

REFERENCIAS

[1] ISO (International Organization for Standardization) (**2006**). ISO 4833:2006. Método horitzontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30ºC. ISO.

[2] ISO (International Organization for Standardization) (**1998**). ISO 15214:1998. Método horizontal para recuento de bacterias ácido lácticas mesófilas ISO.

SESIÓN 5B. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA EN LA EVALUACIÓN DE RIESGOS BIOLÓGICOS EN EFSA

Fernández Pablo S.[1], Garre Alberto[1], Martínez Antonio[2]
1 Universidad Politécnica de Cartagena/Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal, Unidad Asociada IATA-CSIC/Dpto. Ingeniería de Alimentos y E.A.. Paseo Alfonso XIII, 48; 30203 Cartagena, España.
2 Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos; Unidad Asociada IATA-CSIC; 46100 Paterna (Valencia).
pablo.fernandez@upct.es

La evaluación cuantitativa de riesgos permite establecer la probabilidad de un efecto adverso sobre los consumidores asociado a la exposición a un determinado peligro en la cadena alimentaria. También determina los límites de un peligro que pueden suponer un riesgo para la población basado en información científica contrastada. Está integrada por la identificación y caracterización del peligro, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) constituye el eje básico de la Evaluación de Riesgos en la Unión Europea. Su objetivo es garantizar la seguridad en la alimentación humana y animal. Proporciona asesoramiento científico y una comunicación transparente sobre los riesgos alimentarios existentes y emergentes, en estrecha colaboración con los Estados miembros.

Las competencias de la EFSA cubren la evaluación de la alimentación humana y animal, la salud y bienestar animal, la protección de cultivos y la protección del medio ambiente en dichos ámbitos. Actualmente las decisiones relacionadas con la inocuidad alimentaria deben basarse en una aproximación basada en el riesgo, “risk-based approach”, es decir que debe existir una justificación asociada a peligros presentes en alimentos para la población o para la producción agrícola o ganadera. La EFSA proporciona asesoramiento científico cuando se le solicita por parte de las instituciones europeas o por iniciativa propia.

La microbiología predictiva permite simplificar procesos que tienen lugar mediante hipótesis que describen el comportamiento microbiano mediante ecuaciones, que normalmente presentan un número variable de coeficientes constantes desconocidos y que se estiman a partir de datos experimentales (Garre et al., 2017). La modelización matemática aplicada a la microbiología de alimentos permite dos propósitos: la predicción (simular la evolución microbiana durante las distintas etapas de la cadena alimentaria) y la infererencia (interpretación de los parámetros del modelo) [1].

En el Panel de Peligros Biológicos (BIOHAZ) de EFSA se utilizan herramientas de microbiología predictiva para establecer un diseño de toma de decisión basada en la cuantificación del riesgo. Por ejemplo, se ha utilizado un modelo de inactivación de virus para establecer la relación del diseño del procesado térmico de moluscos bivalvos con el riesgo para la salud de los consumidores [2].

Se considera que el establecimiento de un valor F a una temperatura de referencia como un criterio de proceso requiere definir la reducción necesaria del virus y considerarla como un criterio de actuación. Ello permite calcular distintos niveles de inactivación y establecer el cumplimiento del criterio establecido [2].

Se han desarrollado modelos predictivos de inactivación en condiciones dinámicas que permiten establecer el aumento de resistencia tras exposición a condiciones de estrés y que pueden ser muy útiles para definir correctamente el impacto del historial previo sobre la capacidad de supervivencia de microbiana [3].

La microbiología predictiva es un instrumento de gran utilidad en la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos y para la toma de decisiones. El disponer de modelos adecuados que permiten describir la evolución de los riesgos en la cadena alimentaria es de gran importancia para establecer el riesgo. El uso de un diseño de proceso basado en riesgo permite establecer una correlación entre el objetivo de proceso y su impacto sobre la salud pública.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de MINECO y del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del proyecto AGL2017-86840-C2-1-R. Alberto Garre agradece a MINECO a ayuda recibida para realizar su tesis doctoral, con ref. BES-2014-070946. Los autores reconocen la contribución de la Unidad Asociada de Conservación y Seguridad de Alimentos IATA (CSIC)-UPCT.

REFERENCIAS

[1] A. Garre, P.S. Fernandez, R. Lindqvist, J.A. Egea. *Food Res. Int.* **2017.** *93,* 66 - *74*.

[2] W. Messens, P. S. Fernandez Escamez, D. Lees, R Lindqvist, M. O'Mahony, E. Suffredini, J. Cortiñas Abrahantes, E. Chantzis, K. Koutsoumanis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**. *DOI 10.1080/10408398.2017.1338246*.

[3] A. Garre, J.P. Huertas, G. González-Tejedor; P. S. Fernández, J.A. Egea, A. Palop, A. Esnoz. *Int. J. Food Microbiol.* **2018**. *266,* 133 – *141.*

APLICACIÓN DE MODELIZACIÓN MATEMÁTICA PARA DISEÑAR TRATAMIENTOS DE CARNE DE POLLO SEGUROS CON UN MÍNIMO IMPACTO EN LA CALIDAD SENSORIAL

Clemente-Carazo Marta, Garre Alberto, Periago Paula M., Esnoz Arturo, Palop Alfredo, Fernández Pablo S.

Departamento de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola, Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena (ETSIA), Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, España

pablo.fernandez@upct.es

Introducción

El desarrollo de nuevos productos puede suponer un riesgo desde el punto de vista de seguridad alimentaria. Por ello, la industria alimentaria se apoya cada vez más en herramientas matemáticas que permitan garantizar la seguridad y calidad (nutricional y sensorial) de los productos durante su vida útil. Estas técnicas se engloban dentro de la llamada microbiología predictiva, capaz de describir la respuesta microbiana a tratamientos de inactivación.

En este estudio, se aplicaron técnicas de modelización predictiva para describir la cinética de inactivación de *Listeria monocytogenes* en pechuga de pollo durante una técnica de cocinado novedoso: la cocina *sous-vide*, que consiste en el cocinado de la carne a baja temperatura y envasada al vacío. Además, se evaluó el impacto de la intensidad del cocinado en la calidad del producto.

Materiales y Métodos

Preparación de la muestra

Se desarrolló una técnica experimental para simular la inactivación de *L. monocytogenes* en superficie durante el cocinado. Para la preparación de la muestra nos basamos en el estudio [1], con algunas modificaciones. Se introdujeron 10g de pechuga de pollo previamente picada en bolsas de vacío, se añadieron 45mL de agua de peptona y se inocularon las muestras con un 1mL de *L. monocytogenes* a una concentración de 10^8 UFC/ml. Se volvieron a envasar a vacío para aplicarles los distintos tratamientos. Adicionalmente, se siguió un procedimiento similar utilizando PCA (Plate Count Agar) en lugar de carne de pollo.

Tratamientos térmicos

La cinética de inactivación de *L. monocytogenes* durante el cocinado se evaluó mediante tratamientos isotérmicos en un baño térmico (Ultrasonic Vaivén 6032011, Selecta). Una vez la temperatura del agua en el baño se estabilizó, se introdujo un número suficiente de bolsas previamente inoculadas. Las bolsas se extrajeron a tiempos predeterminados. Los tratamientos se realizaron a 53.6, 56, 59.5 y 62°C. Los ensayos se hicieron por triplicado.

Análisis fisicoquímico de la carne

Se midieron varios parámetros fisicoquímicos de la carne al final del tratamiento. El color se midió con un fotocolorímetro de reflexión (Minolta Data Processor DP-301 for Chroma Meter CR-300 series; Ramsey, NJ, EE.UU.). El pH se evaluó por medio de un pH-metro (Medidor PHBasic20; Crison).

Los resultados de pH y color se utilizaron para determinar el tipo de carne [2,3].

La capacidad de retención de agua se evaluó según [4]. La firmeza de la carne se midió por medio de un texturómetro (TA. XT *plus*; Stable Micro Systems).

Análisis sensorial

Se seleccionó un panel de 10 catadores entrenados, que evaluaron la calidad de la carne al final del tratamiento en una escala de 1 a 9 para distintos aspectos: apariencia, sabor, jugosidad, textura y valoración global.

Resultados y Discusión

La Fig. 1 compara las curvas de inactivación de *L. monocytogenes* obtenidas en carne de pollo y en PCA a las cuatro temperaturas de tratamiento. En todos los casos, se obtuvo una inactivación microbiana de, al menos 5 log UFC/ml para los tiempos de tratamiento probados. El modelo de Geeraerd proporcionó una descripción adecuada de los datos [5]. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los valores D estimados en ambos medios, los resultados en pechuga pollo muestran un hombro de inactivación (60,25 min a 53,6°C, 8,63 min a 56°C, 3.75 min a 59.5°C y 1.92 min a 62°C) que no se observa en el PCA. Esto puede deberse a la presencia de componentes orgánicos en el pollo que protegen a la bacteria al inicio del tratamiento [6].

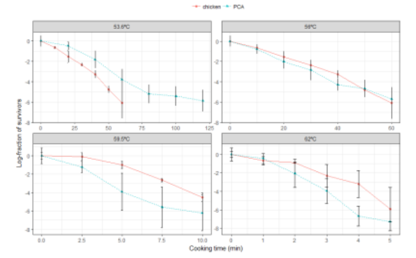


Figura 1: Curvas de inactivación de *L. monocytogenes* en pollo y PCA.

Los tratamientos aplicados tuvieron un impacto limitado en los parámetros fisicoquímicos de la carne (Tabla 1). En todos los casos, la carne se clasificó como "normal" de acuerdo con los límites definidos por [2] y [3].

Temperatura	L*	pH
Control	57,98	6,67
53,6	79,56	5,93
56	80,17	5,87
59,5	76,98	5,73
62	78,72	5,50

Tabla 1: Valores de L* y pH para la determinación del tipo de carne de pollo.

La firmeza de la carne se vio afectada por el cocinado, aumentando con respecto a la carne sin cocinar. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes temperaturas de tratamiento probadas. Además, no hubo diferencias significativas en la capacidad de retención de agua de la carne tratada a las diferentes temperaturas.

La calidad sensorial de la carne al final del cocinado fue aceptable a las cuatro temperaturas probadas (Fig. 2). Las muestras tratadas a la temperatura más alta (62°C) son las que obtuvieron una mayor puntuación.

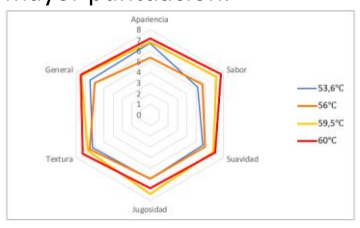


Figura 2: Evaluación sensorial de los distintos aspectos analizados por los catadores.

Conclusiones

El modelo de Geeraerd se puede utilizar para describir la inactivación de *L. monocytogenes* durante el cocinado *sous-vide* de carne de pollo. Posiblemente debido a la presencia de compuestos orgánicos en la carne, se observó un hombro de inactivación durante el tratamiento. Además, los tiempos y temperaturas de tratamiento empleados son adecuados para inactivar *L. monocytogenes*, manteniendo una buena calidad sensorial del producto.

REFERENCIAS

[1] Huang, L. *Food Control* **2013**, *33*, 484–488.
[2] Barbut, S. *Br. Poult. Sci.* **38,** 355–358 (1997).
[3] Woelfel, R. L., Owens, C. M., Hirschler, E. M., Sams, A. R. *Poult. Sci.* **1998***,* 77**,** 62.
[4] Grau, R. & Hamm, R. *Naturwissenschaften* **1953**, *40***,** 29–30.
[5] Geeraerd, A. H., Herremans, C. H., Van Impe, J. F. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *59,* 185–209.
[6] Maté, J. *et al. Food Microbiol.* **2017**, *62,* 270–274.

DESARROLLO DE MODELOS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA PARA LA EVALUACIÓN DE LA PROBABILIDAD DE GERMINACIÓN DE CEPAS ADAPTADAS DE *CLOSTRIDIUM SPOROGENES* A DIFERENTES CONDICIONES DE pH Y NACl

Olague E[1]., Cantalejo I[1]., Valero A[2]., Pérez-Rodríguez F[2]., Romero-Gil V.[3], Medina-Pradas E.[3], Arroyo-López F.N.[3], Garrido-Fernández A.[3]

1 Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadia, s/n, 31006 Pamplona, Navarra.

2 Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Campus de Rabanales s/n. Edif. Darwin Anexo C1. 14014, Córdoba.

3 Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa. Crta. Utrera Km1. Campus Universitario Pablo de Olavide. Edificio 46. 41013. Sevilla.

fnarroyo@cica.es

Clostridium botulinum y *C. perfringens* constituyen patógenos de transmisión alimentaria capaces de producir neurotoxinas a través de la germinación de sus formas esporuladas. *C. sporogenes* está considerada como equivalente no toxigénico de la bacteria proteolítica *C. botulinum*, por lo que se utiliza como microorganismo sustitutivo en estudios de inoculación. La adaptación de estas especies a condiciones de estrés ambiental (temperatura, pH, NaCl etc.) puede hacer que sobrevivan en alimentos fermentados de baja acidez o bajo condiciones de almacenamiento prolongadas.

A través del desarrollo y aplicación de modelos de microbiología predictiva se puede conocer el efecto de los principales factores que influyen sobre el desarrollo microbiano en matrices alimentarias, siendo una herramienta de gran utilidad para las industrias alimentarias y administración sanitaria [1]. Los modelos de probabilidad son un grupo de modelos predictivos que describen si un microorganismo puede o no crecer o germinar bajo unas condiciones específicas de almacenamiento. La aplicación de modelos de probabilidad (o crecimiento/no crecimiento) es altamente interesante para la predicción de microorganismos productores de toxinas, o para aquellas especies que tengan dosis infectivas bajas, ayudando al productor de alimentos a la hora de tomar decisiones acerca de la formulación, procesamiento, envasado y almacenamiento de un producto [2].

En el presente trabajo se han desarrollado modelos de regresión logística para la evaluación de la probabilidad de germinación de cepas adaptadas a pH 5,5 de *C. sporogenes*, así como cepas no adaptadas, bajo diferentes condiciones de pH (4,0 – 7,0) y concentración de NaCl (0 – 6%), y tiempos de incubación de las esporas a 30ºC (1 - 42d).

Para ello, se utilizaron cepas de *C. sporogenes* CECT 485, CECT 892 y CECT 4990, las cuales se adaptaron a condiciones de pH ligeramente ácido (5,5). Las respuestas se compararon con cepas no adaptadas (pH 7,0). La activación de la esporulación se llevó a cabo en medio tioglicolato a 80ºC durante 15 min. Posteriormente, se inoculó una suspensión de esporas (~10^4 UFC/ml) en medio DRCM modificado a distintas condiciones de pH y NaCl anteriormente mencionadas. La evaluación del crecimiento se realizó en placas microtiter (8 pocillos por condición) incubadas a 30ºC. La germinación de las esporas se observó por un viraje a negro de

los pocillos debido a la reducción de sulfitos. Los datos obtenidos se procesaron en MS Excel y se ajustaron a modelos de regresión logística con ayuda del programa R v3.4.0 utilizando la función *glm*. Para ello, se siguió un método de regresión por pasos, eliminando aquellas variables no significativas (p>0,05). Para la evaluación de la bondad de ajuste del modelo, se calcularon los coeficientes Hosmer-Lemeshow, chi-cuadrado de Pearson, el coeficiente de determinación ajustado (R^2), así como el porcentaje de casos correctamente clasificados (c).

Las estimaciones de los modelos consideraron germinación cuando la probabilidad estimada > 0.125 (1/8 pocillos). Los modelos presentaron un buen ajuste a los datos observados, con más de un 96% de casos correctamente clasificados. *C. sporogenes* no fue capaz de germinar a pH < 5,0 aunque la adaptación de las cepas produjo un incremento de la probabilidad de germinación a niveles de pH ácido (5,0 – 5,5), así como a altas concentraciones de NaCl (6%).

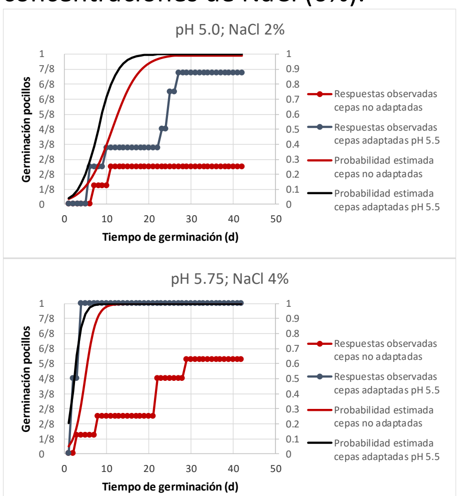


Figura 1. Respuestas observadas y estimadas por el modelo de regresión logística de la probabilidad de germinación de *C. sporogenes* a diferentes valores de pH y condiciones de NaCl.

Los resultados obtenidos mostraron que la germinación de las cepas adaptadas a pH ácido fue más rápida a las condiciones de pH y NaCl estudiadas. A valores de pH ácido (5,0), se obtuvo que las cepas adaptadas germinaron a los 10 d de incubación, mientras que el tiempo de germinación de las cepas no adaptadas aumentó hasta los 15 d. Asimismo, como se puede observar en la Figura 1, a pH 5,75 y NaCl = 4% la germinación de los pocillos en el caso de las cepas adaptadas tuvo lugar en un tiempo inferior a 7d, mientras que las cepas no adaptadas germinaron en 5 de los 8 pocillos a lo largo de los 42 d de almacenamiento.

Se concluye que el efecto de la adaptación de ciertas cepas a ambientes ácidos puede ser útil para evaluar el efecto de formulaciones alternativas en alimentos fermentados

AGRADECIMIENTOS

La realización de este estudio ha sido posible a través de la financiación recibida por el gobierno de la Junta de Andalucía con el proyecto PrediAlo (AGR-7755: www.predialo.science.com.es) junto con fondos FEDER. Asimismo, el grupo HIBRO (PAIDI AGR-170) de la Universidad de Córdoba ha contribuido al desarrollo del estudio.

REFERENCIAS

[1] Pérez-Rodríguez, F., Valero, A. Predictive microbiology in foods. SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition, **2013**. ISBN 978-1-4614-5519-6.

[2] Mette, A., Nauta, M., Beck, H., Aabo, S. *Int. J. Food Microbiol.* **2017,** *240*, 102-107.

MODELIZACIÓN DE LA ACTIVACIÓN TÉRMICA DE ESPOROS SUPERLATENTES

Ruiz-Artiga V., Lasheras L., Marcén M., Mañas P., Condón S.
Universidad de Zaragoza/Facultad de Veterinaria/Tecnología de los Alimentos/Miguel Servet, 177 50013
vrartiga@unizar.es

Introducción

Los esporos "superlatentes" son incapaces de germinar en las condiciones habituales de cultivo. Para que estos esporos inicien la germinación es necesario que previamente sean activados por un estímulo externo. El calor es uno de los estímulos más conocido; por tanto, al inicio de un tratamiento térmico se producen dos fenómenos contrapuestos: por un parte la activación, que tiende a aumentar el recuento, y por otro la inactivación térmica, que tiende a reducirlo. Del balance de ambos fenómenos dependerá la aparición y forma de los hombros en las gráficas de supervivencia.

Durante decenios se han buscado modelos matemáticos que permitan ajustar los recuentos en las fases de hombro y deducir la cinética de activación de los esporos superlatentes, aunque con un éxito escaso. El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar un modelo adecuado para este propósito y estudiar el efecto de la temperatura y el pH en la velocidad de activación.

Material y Métodos

El objeto de estudio fue una suspensión de *G. stearothemophilus* que contenía un 90% de esporos superlatentes. Los tratamientos térmicos se aplicaron en un termorresistómetro TR-SC [1] y las células se recuperaron en agar nutritivo con un 0,6% (p/v) de extracto de levadura. Las placas se incubaron a 55ºC durante 48 horas.

Resultados y Discusión

Los modelos existentes en la bibliografía fueron desarrollados principalmente para calcular tratamientos de esterilización, objetivo para el que son adecuados, pero no lo son tanto para describir la cinética de activación.

En este trabajo se desarrolló un nuevo modelo. Para desarrollar la fórmula asumimos, como en la mayoría de los modelos existentes, que en la población existían dos fracciones de esporos: latentes y superlatentes, que los superlatentes se transformaban en latentes como consecuencia de la activación térmica, y que las cinéticas de muerte y activación seguían un curso exponencial; pero además, asumimos que en los instantes previos a la destrucción por el calor se producían fenómenos de daño y reparación celular. La Figura 1 esquematiza el proceso.

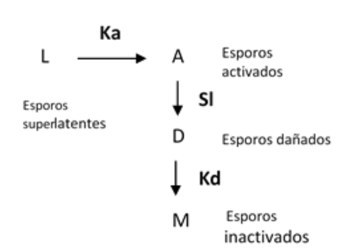


Figura 1: Diagrama del modelo propuesto.

Según nuestra hipótesis la población de esporos superlatentes (L) se transformaría en esporos activados (A) a un ritmo definido por la constante de activación (ka). Los esporos activados se dañarían (D) lo que daría lugar a la aparición de un "flat shoulder" de una duración SL. Finalmente, los esporos dañados se destruirían (M) a un ritmo definido por la constante de inactivación Kd.

Existe ya un modelo muy adecuado y bien contrastado para describir el paso de A a

M, considerando la existencia de un daño previo, el modelo de Geeraerd *et al.* [2]. Una pequeña dificultad del modelo de Geeraerd es que utiliza logaritmos neperianos para los cálculos lo que dificulta la comparación de las constantes obtenidas en el ajuste con la mayoría de las existentes en la bibliografía. Por ello decidimos transformar la fórmula original en otra semejante en logaritmos decimales. Esta transformación es muy corriente en nuestros días, por ejemplo para describir las curvas de supervivencia. La ecuación de Geeraerd *et al.* (2000) transformada sería:

$$Log\ N = Log10\ (N0*10(-Kd*t))\ *(10(Kd*SL))\ /\ (1+ (10(Kd*SL)-1)*10(-Kd*t)))$$

Esta ecuación no permite modelizar el aumento de recuento inicial ya que no considera la activación de los esporos superlatentes. El número de esporos activados vendría descrito por la ecuación:

$$N0=A0+L0-L0*10(-Ka*t)$$

Incluyendo esta última ecuación en la de Geeraerd transformada obtendríamos la siguiente ecuación, que es la expresión matemática de nuestro modelo:

$$Log\ N = Log10\ ((A0+L0-L0*10(-Ka*t)\ )*10(-Kd*t)*(10(Kd*SL))/(1+(10(Kd*SL)-1)*10(-Kd*t))$$

Como se muestra en la tabla 1 el ajuste de nuestro modelo a los datos experimentales resultó excelente a todas las temperaturas y pHs de tratamiento, como demuestra la proximidad a 0 de los valores RMSE y la proximidad a 1 de los valores Af y Bf. Estos valores fueron mejores que los obtenidos al ajustar las curvas con otros tres modelos de la bibliografía.

De los parámetros calculados se deduce que tanto la velocidad de activación como la de muerte son función exponencial de la temperatura a los tres pHs (Figura 2).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre las pendientes de las líneas de regresión, ni de la activación ni de la inactivación, a los tres pHs investigados, lo que nos permitió establecer unos valores z de 11,4 y 9,2 para ambos fenómenos.

Al contrario que la constante de muerte, la constante de activación por el calor alcanzó un mínimo a pH 5,5, aumentado tanto con la acidificación como con la alcalinización. De nuestro trabajo se concluye que la velocidad de muerte térmica es mayor que la de activación de los superlatentes, y que las diferencias en velocidad disminuyen con la temperatura de tratamiento.

Tabla 1: Efecto del pH y la temperatura en la cinética de activación y muerte de esporos de *G. stearothermophilus.*

	Temperatura (ºC)	*ka*	*kd*	*SL*	*RMSE*	B_F	A_F
7	107	0,016	0,024	14,40	0,065	1,002	1,000
	110	0,045	0,023	1,845	0,064	1,002	1,000
	115	0,118	0,131	4,575	0,158	1,000	1,005
	120	0,180	0,854	1,670	0,071	1,000	1,001
5,5	107	0,003	0,082	27,20	0,043	0,999	1,000
	110	0,008	0,076	12,79	0,066	0,997	1,001
	115	0,032	0,182	3,878	0,074	0,999	1,001
	120	0,070	1,062	1,514	0,042	1,001	1,001
4	100	0,016	0,019	0,000	0,070	0,996	1,001
	105	0,016	0,124	10,94	0,055	1,000	1,000
	107	0,027	0,162	7,383	0,088	1,003	1,002
	110	0,076	0,248	2,134	0,143	0,992	1,014

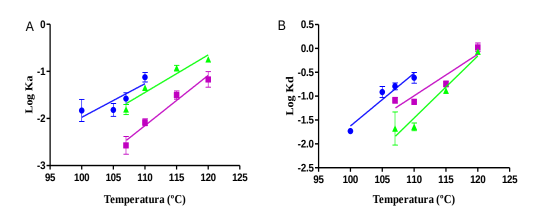


Figura 2: Relación de las constantes de activación (A) y muerte (B) con la temperatura de tratamiento para cada pH: (●) pH4, (●) pH 5,5 y (●) pH 7.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el proyecto AGL 2015-69565-P, y apoyado por la Red BIOQURA, FEDER, FSE y departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad de Aragón.

V. Ruiz es beneficiaria de una beca predoctoral del MINECO.

REFERENCIAS

[1] S. Condón, M. Arrizubieta, F. Sala, *J. Microbiol. Methods*, **1993**, *18*, 357-366.

[2] A.H. Geeraerd, C.H. Herremans, J.F. Van Impe, *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *59*, 185-209.

NUEVO MÉTODO DE DETECCIÓN RÁPIDA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN MATRICES ALIMENTARIAS

Sanchís J.

Laboratorios MICROKIT, S.L. P.O. Box 44, Valdemorillo 28210-Madrid

consultas tecnicas@microkit.es

Se compara el método ISO 11290 de detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos con un nuevo método rápido por acortamiento de los enriquecimientos (Listeriquick). Se busca *Listeria monocytogenes* (2 dianas inoculadas: WDCM00019 y WDCM00021) en 20 alimentos diferentes típicamente susceptibles de su presencia, incluyendo como interferentes *L. innocua* WDCM00017 y *L. ivanovii* WDCM00018; y como acompañantes cantidades muy superiores de *Bacillus cereus* WDCM00001, *Staphylococcus aureus* WDCM00032, *Micrococcus luteus* WDCM00111, *Enterococcus faecalis* WDCM00009 y *E. coli* WDCM00013, además de la microbiota acompañante propia de cada matriz alimentaria empleada.

Se realizan para cada uno de los dos métodos 20 positivos para conocer la sensibilidad, 20 negativos para conocer la especificidad y 20 positivos débiles para conocer el límite de detección de cada una de las dos técnicas.

Las 20 matrices alimentarias empleadas fueron: Salmón ahumado con eneldo, Requesón, Jamon york loncheado y envasado, Leche de cabra, Langostinos congelados, Paté de pato, Mortadela de aceitunas loncheada y envasada, Ensalada (canónigos embolsados, tomate, pimiento verde embolsado), Queso azul envasado, Salchichas de cerdo embutidas, Salchichas de Frankfurt envasadas, Pollo crudo natural, Helados (miniconos de nata y chocolate), Queso Brie envasado, Huevo hilado envasado, Boquerones en vinagre, Chorizo loncheado y envasado, Salsa romesco, Sobrasada envasada y Zanahoria rallada embolsada. Lo cual no limita el uso de Listeriquick a sólo estos alimentos.

El inóculo de cepas diana en las 20 muestras positivas es de 23 ufc de *L. monocytogenes* WDCM 00019 en unas muestras y de 48 ufc de *L. monocytogenes* WDCM 00021 en las demás. En todas ellas hay interferentes y acompañantes a niveles 1-2 log por encima de las diana.

El inóculo conseguido de cepas diana en las 20 muestras positivas débiles (para estudiar el límite de detección) es de 12, 8, 6, 4 y 3 ufc/25 g, bajando las interferentes y acompañantes proporcionalmente a 1-2 log por encima de cada concentración diana.

El inóculo en las cepas no-diana en las 20 muestras negativas es de 10^4-10^6 ufc/25 g.
Se incubaron todas las muestras a 35ºC durante un total de 36 h para el método rápido Listeriquick, y de 72 h para el método ISO 11290.

Las colonias obtenidas en el medio Ottaviani & Agosti (Chromocytogenes Agar) se confirmaron con la simple prueba de la Xylosa/Rhamnosa para diferenciar *L. monocytogenes* de *L. ivanovii*.

Los resultados obtenidos demuestran que el método Listeriquick detecta exactamente igual que el método ISO 11290, con la ventaja de ahorrar 36h en la lectura de resultados, ya que ambos cumplen con los 3 criterios estándar básicos de validación cualitativa: En ambos métodos, la Sensibilidad resulta del 95% (a causa de un falso negativo en matriz de

pollo en ambos métodos), la Especificidad del 100% (ni un solo falso positivo), la Eficiencia es del 97,5% el límite de detección se demuestra hasta 3 ufc/25 g, y la precisión (medida como conformidad) es del 100%.

ÍNDICE DE AUTORES

PATROCINADORES

Agradecemos a todos los organismos, instituciones y empresas, que han participado o patrocinado de diversas maneras en la organización y realización de este XXI Congreso de Microbiología de los Alimentos 2018 en Tarragona, y que se señalan a continuación.

Sociedad Española de Microbiología



Grupo Especializado SEM de Microbiología de los Alimentos



Universitat Rovira i Virgili



Fundació Universitat Rovira i Virgili



Federation of European Microbiological Societies



Diputació de Tarragona



iMicroQ



Biópolis - ADM



Biomérieux



Agrovin



Lallemand



Fisher Scientific



Grupo Freixenet



Miguel Torres S.A.



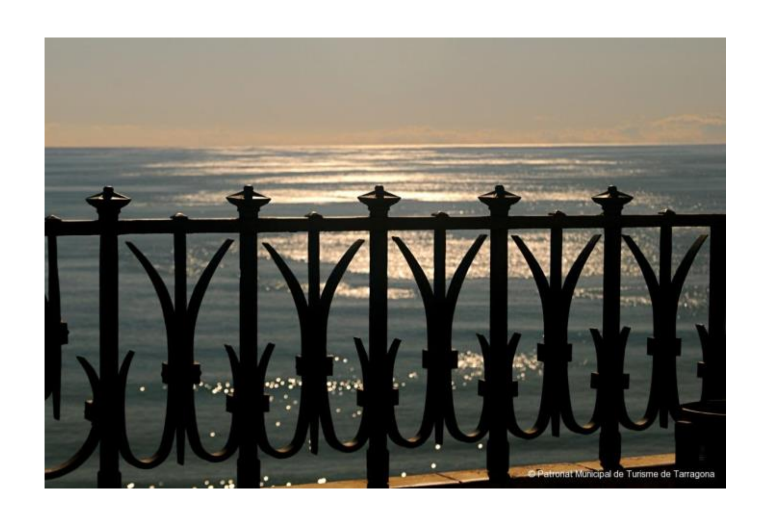
DDBiolab



Mahou San Miguel







"Balcó del Mediterrani", mirador de Tarragona al mar